

Análise de polimorfismos genéticos nos genes *ERCC1* e *XRCC3* e a sua influência na resposta ao tratamento de doentes com cancro do colo do útero

Sílvia Carneiro Soares

M
2016



Sílvia Carneiro Soares. Análise de SNP's nos genes *ERCC1* e *XRCC3* e a sua influência na resposta ao tratamento de doentes com CCU



M.ICBAS 2016

Análise de polimorfismos genéticos nos genes *ERCC1* e *XRCC3* e a sua influência na resposta ao tratamento de doentes com cancro do colo do útero

Sílvia Carneiro Soares

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR



SÍLVIA CARNEIRO SOARES

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NOS GENES *ERCC1* E *XRCC3* E A SUA INFLUÊNCIA NA RESPOSTA AO TRATAMENTO DE DOENTES COM CANCRO DO COLO DO ÚTERO

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Oncologia, no ramo de Oncologia Molecular, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva

Professor Associado com Agregação da Universidade Fernando Pessoa e Coordenador do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil do Porto – IPOFGP, EPE

Co-orientador – Professora Doutora Isabel Guedes Bravo

Investigadora no Grupo de Física Médica, Radiobiologia e Proteção Radiológica do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil do Porto – IPOFGP, EPE e Professora adjunta convidada da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Co-orientador – Mestre Augusto Nogueira

Doutorando do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil do Porto – IPOFGP, EPE

INFORMAÇÃO TÉCNICA

TÍTULO:

Análise de polimorfismos genéticos nos genes *ERCC1* e *XRCC3* e a sua influência na resposta ao tratamento de doentes com cancro do colo do útero

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre em Oncologia, apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

AUTOR:

Sílvia Carneiro Soares

DATA:

Setembro de 2016

EDITOR: Sílvia Carneiro Soares

CORREIO ELECTRÓNICO: silvia_27_01@hotmail.com

1ª EDIÇÃO: Setembro de 2016

Dedicatória

Aos meus pais.

Agradecimentos

Agradeço à Comissão de Coordenação do Mestrado em Oncologia, sob a pessoa da Professora Maria Berta Silva, a oportunidade de ingressar neste mestrado e de enriquecer os meus conhecimentos científicos na área da oncologia.

Agradeço ao coordenador do Grupo de Oncologia Molecular e ao meu orientador, Professor Doutor Rui Medeiros, a oportunidade que me foi concedida de integrar neste serviço e de desenvolver este trabalho. Para além do mais, agradeço toda a sua orientação, disponibilidade, amabilidade e motivação que foi transmitida ao longo de todas as reuniões.

Agradeço à Professora Doutora Isabel Bravo, pela ajuda que me concedeu, desde a inserção na equipa de investigação até à entrega deste trabalho. Obrigada pela sua dedicação, disponibilidade, amabilidade, confiança, encorajamento e apoio. Sem o seu impulso, este trabalho não seria possível.

Agradeço ao Mestre Augusto Nogueira, a sua disponibilidade, a sua incansável ajuda, a sua predisposição em analisar este trabalho, a sua dedicação, a paciência que deteve ao longo deste ano e por me ter incentivado e apoiado nas alturas mais difíceis da elaboração deste projeto. Para si, o meu muito obrigado.

Agradeço a todos os investigadores presentes no Grupo de Oncologia Molecular, pela simpatia, pela afabilidade, pela partilha de conhecimentos, por estarem sempre disponíveis, por motivarem e alegrarem todo o ambiente de trabalho.

Agradeço às minhas amigas, Ana Rita Coelho, Ana Sofia Coelho e Diana Sousa pela amizade, pelo incentivo, por me terem apoiado incondicionalmente e compreendido nos momentos mais difíceis, por nunca deixarem faltar uma boa gargalhada e muito boa disposição. Mais uma vez, levo comigo os excelentes momentos que passamos juntas. Em especial à Ana Rita Coelho, reforço o meu agradecimento, tendo em conta que partilhamos e vivemos bons momentos e superamos as nossas dificuldades sempre com o apoio mútuo e incondicional.

Agradeço aos meus amigos, que sempre acreditaram em mim, que me motivaram, que me ouviram, que me distraíram, que me fizeram rir, que no fundo me fizeram estar sempre feliz ao longo deste percurso.

Sem palavras para descrever tudo o que fizeram por mim, dedico e agradeço este trabalho, aos *meus Pais*.

O meu muito obrigado.

Abreviaturas e siglas

A

A – Adenina

ATM – *Ataxia Telangiectasia Mutated*

ATR – *Ataxia Telangiectasia and Rad3 related Protein Kinase*

B

BER – Reparação por Excisão de Base

BIR – *Break-Induced Replication*

BLM – Complexos nucleasse - helicase da helicase *Bloom*

Bp – Pares de bases

BRCA 1 – *Breast cancer 1*

BRCA 2 – *Breast cancer 2*

BT – Braquiterapia

C

C – Citocina

CCU – Cancro do colo do útero

CDK – Cinase dependente da ciclina

CENT2 – *Centrin-2*

CPNPC – Cancro do pulmão de não pequenas células

CR – Cirurgia

CSA – Grupo de Complementação A do Síndrome de *Cockayne A*

CSB – Grupo de Complementação B do Síndrome de *Cockayne B*

D

DDR – Resposta aos danos no DNA

DE – Doença estável

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio padrão

dsDNA – Cadeia dupla de DNA

DSB – Quebras de cadeia dupla

DSBR – *Double-Strand Break Repair*

E

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERCC1 – *Excision repair cross-complementation group 1*

F

FIGO – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

G

GG-NER – *Global Genome NER*

Gln - Gutamina

H

HbCO – Carboxihemoglobina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV – Vírus Papiloma Humano

HR – Recombinação Homóloga

HWE – Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

I

IC – Intervalo de confiança

ICL's – Ligações cruzadas intercadeias

IMRT – Radioterapia de intensidade modulada

J

JH – Junção de *Holliday*

L

LEEP – *Loop Electrosurgical Excision Procedure*

LOH – Perda de heterozigosidade

Lys – Lisina

M

Met – Metionina

MGB – *Minor Groove Binder*

MGMT – *O6-alkylguanine DNA alkyltransferase*

MMR – Reparação de erros de emparelhamento ou "*Mismatch Repair*"

MRN – Complexo Mre11-RAD50-Nbs1

mRNA – RNA mensageiro

N

NER – Reparação por excisão de nucleótidos

NHEJ – Reparação por união terminal não homóloga

O

OH – Grupo hidróxido

OR - *Odds Ratio*

P

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular

PCR – *Polymerase chain reaction*

PD – Progressão da doença

pRb – Gene do retinoblastoma

Q

QRT – Quimioradioterapia

QT – Quimioterapia

R

RAD51 – *RAD51 recombinase*

RAD52 – *RAD52 recombinase*

RAD54 – *RAD54 recombinase*

RC – Resposta completa

RECIST – Critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos

RFC – Fator de replicação C

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RI – Radiação Ionizante

RNAPII – RNA polimerase II

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

RP – Resposta parcial

RPA – Proteína de replicação A

RT – Radioterapia

S

SDSA – *Synthesis-Dependent Strand Annealing*

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

SSA – *Single-Strand Annealing*

SSB – Quebra de cadeia simples

ssDNA – DNA de cadeia simples

T

T – Timina

TC – Tomografia Computadorizada

TC-NER – *Transcription-Coupled NER*

TFIIH – Fator de transcrição Humano II

Thr – Treonina

TOPOIII α – Topoisomerase

U

UV – Radiação Ultravioleta

V

VNTR – *Variable Number of Tandem Repeats*

X

χ^2 – Teste do qui-quadrado

XP – Xeroderma pigmentoso

XPA – Grupo de Complementação A do Xeroderma Pigmentoso A

XPB – Grupo de Complementação B do Xeroderma Pigmentoso B

XPC – Grupo de Complementação C do Xeroderma Pigmentoso C

XPD – Grupo de Complementação D do Xeroderma Pigmentoso D

XPE – Grupo de Complementação E do Xeroderma Pigmentoso E

XPF – Grupo de Complementação F do Xeroderma Pigmentoso F

XPB – Grupo de Complementação G do Xeroderma Pigmentoso G

XRCC2 – *X-ray Repair Complementing Defective Repair in Chinese Hamster Cells 2*

XRCC3 – *X-ray Repair Complementing Defective Repair in Chinese Hamster Cells 3*

Índice

Dedicatória.....	II
Agradecimentos.....	IV
Abreviaturas e siglas	IX
Índice	XIII
Índice de figuras	XVII
Índice de tabelas	XIX
Resumo.....	XXI
Palavras-Chave	XXIV
<i>Abstract</i>	XXV
Key Words.....	XXVIII
I. Introdução.....	1
1. Cancro – Considerações gerais.....	3
2. Cancro do colo do útero	4
2.1. Fatores de risco	7
2.2. Tratamento.....	8
2.2.1. Cirurgia	9
2.2.2. Radioterapia	10
2.2.3. Quimioterapia	10
2.2.4. Quimioradioterapia	11
2.3. Efeitos secundários.....	11
3. Reparação do DNA e cancro	12
3.1. Tipos de danos.....	13
3.2. Vias de reparação do DNA	15
3.2.1. Reparação por excisão de nucleótidos (NER).....	16
3.2.2. Reparação por Recombinação Homóloga (HR)	20
4. A variabilidade genética e a sua influência na resposta ao tratamento.....	23
4.1. Contributo dos polimorfismos genéticos.....	23

II.	Objetivos.....	27
1.	Objetivo geral.....	29
2.	Objetivos específicos.....	29
III.	Materiais e Métodos	31
1.	Caracterização da população	33
2.	Procedimentos laboratoriais	35
IV.	Resultados	43
1.	Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos <i>ERCC1 C8092A</i> e <i>XRCC3 Thr241Met</i>	45
2.	Avaliação da influência dos polimorfismos <i>ERCC1 C8092A</i> e <i>XRCC3 Thr241Met</i> na resposta terapêutica	46
3.	Análise da associação entre os polimorfismos <i>ERCC1 C8092A</i> e <i>XRCC3 Thr241Met</i> e os <i>endpoints</i> clínicos:	47
3.1.	Sobrevivência Global	47
3.2.	Sobrevivência livre de doença	48
4.	Determinação do efeito dos polimorfismos <i>ERCC1 C8092A</i> e <i>XRCC3 Thr241Met</i> na expressão de toxicidades provenientes da quimiorradioterapia	51
V.	Discussão	57
1.	Análise das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos <i>ERCC1 C8092A</i> e <i>XRCC3 Thr241Met</i>	60
2.	Associação do polimorfismo <i>ERCC1 C8092A</i> com a resposta à quimiorradioterapia, a sobrevivência global e a sobrevivência livre de doença nas doentes com cancro do colo do útero	60
3.	Relação do polimorfismo <i>XRCC3 Thr241Met</i> com a resposta à quimiorradioterapia, a sobrevivência global e a sobrevivência livre de doença nas doentes com cancro do colo do útero	64
4.	Efeito dos polimorfismos <i>ERCC1 C8092A</i> e <i>XRCC3 Thr241Met</i> na expressão de toxicidades provenientes da quimiorradioterapia	65
VI.	Conclusão.....	69
VII.	Bibliografia	73
VIII.	Anexos	91

Anexo I	93
Anexo II	95

Índice de figuras

Figura 1 - <i>Hallmarks</i> do cancro	4
Figura 2 - Incidência dos tumores malignos mais frequentes no sexo feminino, no Mundo, para todas as faixas etárias	4
Figura 3 - Esquema representativo dos mecanismos de resposta aos danos no DNA ...	13
Figura 4 - Efeito da radiação ionizante	14
Figura 5 - Esquema representativo da via NER	17
Figura 6 - Localização do gene <i>ERCC1</i>	19
Figura 7 - Esquema de reparação de danos de cadeia dupla do DNA pela via Recombinação Homóloga	22
Figura 8 - Localização do gene <i>XRCC3</i>	23
Figura 9 - Localização dos SNP's e os seus efeitos biológicos	24
Figura 10 - Representação de um Real Time PCR relativo ao polimorfismo <i>ERCC1 C8092A</i>	38
Figura 11 - Representação das curvas de fluorescência correspondentes a cada genótipo para o polimorfismo <i>ERCC1 C8092A</i>	38
Figura 12 - Curvas de sobrevivência global obtidas pelo método de <i>Kaplan-Meier</i> e teste <i>log rank</i> em doentes com cancro do colo do útero, de acordo com os genótipos dos polimorfismos <i>ERCC1 C8092A</i> e <i>XRCC3 Thr241Met</i>	48
Figura 13 - Curvas de sobrevivência global obtidas pelo método de <i>Kaplan-Meier</i> e teste <i>log rank</i> em doentes com cancro do colo do útero, de acordo com o modelo recessivo para os polimorfismos <i>ERCC1 C8092A</i> (AA vs CC e CA) e <i>XRCC3 Thr241Met</i> (Met/Met (AA) vs Thr/Thr (GG) e Thr/Met (GA))	48
Figura 14 - Curvas de sobrevivência livre de doença obtidas pelo método de <i>Kaplan-Meier</i> e teste <i>log rank</i> em doentes com cancro do colo do útero, de acordo com os diferentes genótipos dos polimorfismos <i>ERCC1 C8092A</i> e <i>XRCC3 Thr241Met</i>	49
Figura 15 - Curvas de sobrevivência livre de doença obtidas pelo método de <i>Kaplan-Meier</i> e teste <i>log rank</i> em doentes com cancro do colo do útero, de acordo com o modelo recessivo para os polimorfismos <i>ERCC1 C8092A</i> (AA vs CC e CA) e <i>XRCC3 Thr241Met</i> (Met/Met (AA) vs Thr/Thr (GG) e Thr/Met (GA))	49
Figura 16 - Curvas de sobrevivência livre de doença obtidas pelo método de <i>Kaplan-Meier</i> e teste <i>log rank</i> em doentes com cancro do colo do útero, de acordo com o estadio (\leq IIa vs \geq IIb) e tendo em conta o modelo recessivo (AA vs CC e CA) para o polimorfismo <i>ERCC1 C8092A</i>	50

Figura 17 – Curva de sobrevivência livre de doença obtida pelo método de <i>Kaplan-Meier</i> e teste <i>log rank</i> em doentes com cancro do colo do útero, de acordo com os hábitos tabagicos (fumadoras/ex-fumadoras vs não fumadoras) e tendo em conta o modelo recessivo (AA vs CC e CA) para o polimorfismo <i>ERCC1 C8092A</i>	51
---	----

Índice de tabelas

Tabela 1 - Estadiamento de FIGO (2009) para o cancro do colo do útero	6
Tabela 2 – Abordagens terapêuticas para o cancro do colo do útero	9
Tabela 3 - Características clínico-patológicas das doentes com cancro do colo do útero submetidas a quimiorradioterapia com cisplatina	34
Tabela 4 - Informação complementar dos assays utilizados e das respectivas sondas específicas.....	39
Tabela 5 - Frequências genótípicas dos polimorfismos <i>ERCC1 C8092A</i> e <i>XRCC3 Thr241Met</i> nas doentes com cancro do colo do útero	45
Tabela 6 - Associação dos polimorfismos <i>ERCC1 C8092A</i> e <i>XRCC3 Thr241Met</i> com a resposta à quimiorradioterapia em doentes com cancro do colo do útero	47
Tabela 7 - Análise univariada entre os genótipos dos polimorfismos <i>ERCC1 C8092A</i> e <i>XRCC3 Thr241Met</i> e as diferentes toxicidades	53
Tabela 8 - Análise univariada entre os genótipos dos polimorfismos <i>ERCC1 C8092A</i> e <i>XRCC3 Thr241Met</i> e as diferentes toxicidades tardias.....	54
Tabela 9 - Análise univariada entre o modelo recessivo para o polimorfismo <i>ERCC1 C8092A</i> (AA vs CA e CC) e a toxicidade gastrointestinal (tardia)	55

Resumo



A nível mundial, o cancro do colo do útero é o quarto cancro mais comum entre as mulheres e é considerado a quarta principal causa de morte por cancro. Geralmente, esta neoplasia tem origem na junção do canal endocervical e a porção do colo do útero e o seu desenvolvimento provém de um processo multifásico.

A quimioradioterapia à base de cisplatina continua a ser a terapia recomendada para as doentes com cancro do colo de útero avançado. Contudo, a evolução clínica destas doentes varia significativamente e torna-se difícil de prever, devido ao desenvolvimento de fenótipos de toxicidade e resistência ao tratamento. Assim, para ultrapassar estes obstáculos à eficácia da terapia, é necessário explorar novos biomarcadores adicionais que sejam mais eficazes na previsão do prognóstico. Neste sentido, sabendo que existe uma relação entre a capacidade de reparação do DNA e a sensibilidade das células tumorais aos fármacos, a presença de alterações genéticas, como os polimorfismos em genes de reparação do DNA, tem vindo a ser alvo de estudo crescente como potenciais fatores preditivos da resposta à terapia.

Na literatura, alguns estudos sugerem que os polimorfismos nos genes *ERCC1* e *XRCC3* podem reduzir a reparação do DNA e serem úteis marcadores moleculares para prever a resposta terapêutica e o prognóstico. O gene *ERCC1* é um dos genes de reparação do DNA mais importantes, pelo que exerce um papel essencial na via de reparação por excisão de nucleótidos (NER), sendo responsável pela reparação de uma grande variedade de danos do DNA. Por sua vez, o gene *XRCC3* encontra-se envolvido na via da recombinação homóloga (HR) e ajuda a manter a estabilidade cromossómica através da reparação dos danos do DNA, nomeadamente os danos de cadeia dupla.

Neste trabalho, foi realizado um estudo retrospectivo incluindo 260 doentes caucasianas com cancro do colo do útero, com estadió entre Ib2 e IVa, tratadas com quimioradioterapia concomitante à base de cisplatina. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de analisar o efeito dos polimorfismos genéticos *ERCC1 C8092A* (rs321986) e *XRCC3 Thr241Met* (rs861539) na evolução clínica destas doentes, nomeadamente na eficácia da resposta terapêutica, sobrevivência global, sobrevivência livre de doença e na expressão de toxicidades provenientes da terapia. A análise dos polimorfismos genéticos foi realizada por discriminação alélica através da técnica *Real time* PCR e a análise estatística dos resultados foi efetuada com o auxílio do programa estatístico SPSS.

Os resultados obtidos demonstraram que ambos os polimorfismos estudados não influenciam a resposta ao tratamento, a sobrevivência global e a sobrevivência livre de doença das doentes com cancro do colo do útero. Contudo, verificou-se a existência de uma associação do polimorfismo *ERCC1 C8092A* com a sobrevivência livre de doença,

quando associada ao tabaco, ou seja, em doentes não fumadoras com genótipo AA verificou-se um intervalo de tempo até à recidiva superior às doentes portadoras dos genótipos CA e CC ($p=0,048$). Para além do mais, observou-se diferenças estatisticamente significativas na associação deste polimorfismo com a toxicidade gastrointestinal tardia ($p=0,038$). Aplicando o modelo recessivo (AA vs CA e CC), constatou-se que as doentes com um genótipo homozigótico AA apresentam um risco de aproximadamente quatro vezes superior de desenvolver toxicidade gastrointestinal tardia comparativamente às doentes portadoras do alelo C (OR=3.727, IC 95% 1.199-11.588; $p=0,017$).

Em suma, estes resultados podem contribuir para uma melhor compreensão da influência de polimorfismos genéticos em genes associados à reparação do DNA na evolução clínica de doentes com cancro do colo do útero.

Palavras-Chave

Cancro do colo do útero; Polimorfismos genéticos; Genes de reparação; Resposta à terapia; Sobrevida global; Sobrevida livre de doença; Toxicidade.

Abstract



Cervical cancer is the fourth most common cancer among women and is considered the fourth leading cause of cancer death, worldwide. This cancer generally originates at the junction of the endocervical canal and the portion of the cervix and its development is a multiphase process.

Chemoradiotherapy with cisplatin remains the recommended therapy for patients with advanced cervical cancer. However, the clinical outcome of these patients varies significantly, and it becomes difficult to predict it due to the development of toxicity phenotypes and resistance to treatment. Thus, to overcome the obstacles to the effectiveness of therapy, it is necessary to explore new additional biomarkers that are more effective in predicting the prognosis. In this sense, knowing that there is a relationship between DNA repair capacity and the sensitivity of tumor cells to the drugs, the presence of genetic alterations, such as polymorphisms in DNA repair genes have been growing subject of study as potential predictors of response to therapy.

In the literature, some studies suggest that polymorphisms in *ERCC1* and *XRCC3* gene can reduce the DNA repair and can be useful molecular markers to predict the therapeutic response and prognosis. The *ERCC1* gene is one of the most important genes in DNA repair and therefore plays an essential role in the nucleotide excision repair (NER) pathway, responsible for the repair of a wide range of DNA damage. On the other hand, the *XRCC3* gene is involved in the homologous recombination (HR) pathway and helps maintain chromosomal stability due to the repair of DNA damage, specifically in damage double-strand.

In this work, we performed a retrospective study including 260 caucasian patients with cervical cancer, with stages between Ib2 and IVa, treated with chemoradiotherapy concurrent with cisplatin. This study was developed with the objective to analyze the effect of genetic polymorphisms *ERCC1 C8092A* (rs321986) and *XRCC3 Thr241Met* (rs861539) in the clinical outcome of these patients, including the efficacy of therapeutic response, overall survival, disease free survival and the expression of therapy toxicities. The genetic polymorphisms analysis was performed by allelic discrimination with Real time PCR and statistical analysis was performed with the SPSS statistical program.

The results showed that both studied polymorphisms do not influence response to treatment, overall survival and disease free survival of patients with cervical cancer. However, it was found that there is a relationship between *ERCC1 C8092A* polymorphism and disease free survival when associated with tobacco. In other words, in non-smoking patients with AA genotype showed a disease free survival higher than patients with the CA and CC genotypes ($p=0,048$). Furthermore, we observed statistically significant differences

in the association of this polymorphism with late gastrointestinal toxicity ($p=0,038$). When, applying the recessive model (AA vs CA and CC), it was found that patients with AA homozygous genotype reveal a risk of approximately four times higher of developing late gastrointestinal toxicity compared to patients with the C allele (OR=3.727, IC 95% 1.199-11.588; $p=0,017$).

In conclusion, these results may contribute towards a better understanding of the influence of genetic polymorphisms in genes associated with DNA repair in the clinical outcome of patients with cervical cancer.

Key Words

Cervical cancer; Genetic polymorphisms; Repair genes; Therapy response; Overall survival; Disease free survival; Toxicity.

I. Introdução



1. Cancro – Considerações gerais

O cancro é uma doença heterogénea, complexa e multifatorial, cujas características, desenvolvimento e prognóstico variam de doente para doente, sendo considerado um grave problema de saúde pública (1-3). Estima-se que a incidência desta doença sofra um aumento significativo nos próximos anos. Em 2012, globalmente surgiram 14,1 milhões de novos casos de cancro e a mortalidade associada a esta doença foi de 8,2 milhões de casos. Na Europa em 2012, surgiram mais de 3,4 milhões de novos casos de cancro e estimou-se 1,75 milhões de mortes por cancro (4).

O processo de desenvolvimento tumoral denomina-se por carcinogénese e pode ser dividido em quatro etapas principais: a iniciação, promoção, conversão e progressão. A iniciação do tumor consiste na ocorrência de mudanças que originam danos genéticos irreversíveis. A promoção permite a expansão das células iniciadas por auto-proliferação, induzindo a um crescimento anormal e/ou mutações. Na conversão maligna, ocorre a transformação de uma célula pré-neoplásica numa célula que expressa o fenótipo maligno, através de alterações genéticas e, posteriormente, na progressão, as células destacam-se do tumor primário e invadem outros tecidos e órgãos, formando tumores metastáticos (5).

Apesar da natureza pleiotrópica dos tumores, existem algumas características comuns partilhadas pela maioria das neoplasias, que favorecem o seu crescimento. Assim, as características que orientam a transformação de células normais em células malignas são a estimulação do crescimento, a insensibilidade a sinais inibitórios do desenvolvimento celular provenientes do microambiente, o potencial replicativo ilimitado, a evasão da apoptose, a indução da angiogénese e a ativação da invasão e metastização. O conjunto destas características celulares, adquiridas e alteradas nas células malignas durante a carcinogénese constituem os *Hallmarks* do cancro (Figura 1).

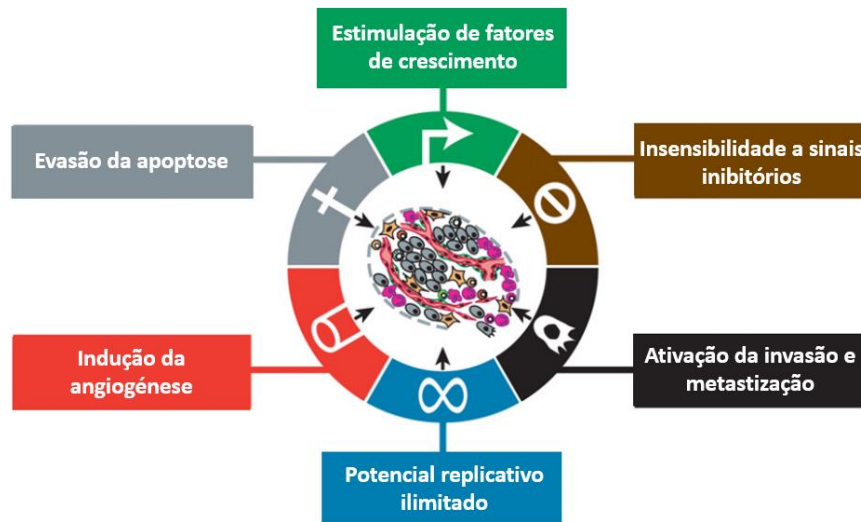


Figura 1 - Hallmarks do cancro (Adaptado de:(6))

2. Cancro do colo do útero

A nível mundial, o cancro do colo do útero (CCU) é o quarto cancro mais comum entre as mulheres e foi estimado que em 2012 surgiram 528,000 novos casos. Relativamente à mortalidade, é considerado a quarta principal causa de morte por cancro, com uma estimativa de 266,000 mortes por ano, representando 7,5% de todas as mortes por cancro no sexo feminino (Figura 2) (7, 8).

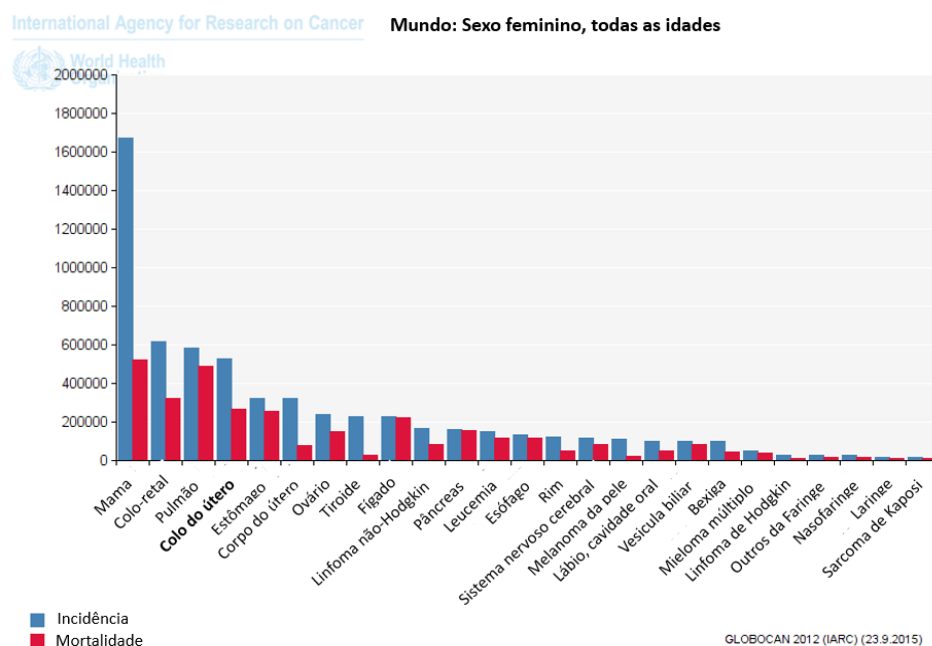


Figura 2 - Incidência dos tumores malignos mais frequentes no sexo feminino, no Mundo, para todas as faixas etárias (Adaptado de: <http://globocan.iarc.fr>)

Na Europa, surgiram 58,300 novos casos e a taxa padronizada por idade foi de 13,4 por 100,000 mulheres. Quanto à mortalidade, estimou-se cerca de 24,400 mortes e a taxa padronizada por idade foi de 4,9 por 100,000 mulheres. Em 2012, Portugal apresentava uma taxa de incidência padronizada por idade de 10,8 por 100,000 e 7200 novos casos. Relativamente à taxa de mortalidade padronizada por idade, esta foi de 4,9 por 100,000 mulheres e o número de mortes foi de 3900 (4).

O cancro do colo do útero tem origem geralmente na junção do canal endocervical e a porção do colo do útero. O seu desenvolvimento é o resultado de um processo multifásico, no qual a lesão é frequentemente associada com uma displasia cervical, seguida pelo aparecimento de um carcinoma *in situ*, que tende geralmente a progredir para um carcinoma invasivo ao longo de 10 a 20 anos, na maioria das doentes (9). O Vírus do Papiloma Humano (HPV) é o principal agente etiológico na carcinogénese do colo do útero, porém, existem outras alterações genéticas que podem promover o seu desenvolvimento, sem envolver diretamente este vírus. O desenvolvimento do CCU pode ser explicado em parte pela regulação e função dos oncogenes virais *E6* e *E7*, pelo que a sua expressão constitutiva é necessária para a manutenção do fenótipo maligno. O produto do gene *E6* liga-se ao gene *p53*, o qual é um supressor tumoral essencial na regulação do crescimento celular e da apoptose, levando à sua degradação. Além disso, o gene *E7* tem como alvo outro gene supressor tumoral, o produto do gene do retinoblastoma (*pRb*), que é responsável pela sua desativação (10-12).

Mais de 90% dos CCU são classificados como carcinomas de células escamosas, 7% a 10% adenocarcinomas e 1% a 2% carcinomas de células claras (9, 13). A classificação destas lesões é baseada no estadiamento de *Federation of Gynecologists and Obstetricians* (FIGO) que está em vigor (9). O exame clínico da doente é crucial para a definição do estadiamento, sendo que o estadio é determinado de acordo com a extensão do tumor para além do colo do útero e a sua invasão nos tecidos adjacentes: paramétrico, parede pélvica, vagina, bexiga e reto (Tabela 1) (14).

Tabela 1 - Estadiamento de FIGO (2009) para o cancro do colo do útero (Adaptado de: <https://cancerstaging.org>)

Estadio	Características clínicas
I	Carcinoma do colo do útero limitado ao útero (extensão para o corpo deve ser desconsiderada)
Ia	Carcinoma invasivo que apenas é diagnosticado por microscopia, com invasão profunda $\leq 5\text{mm}$ medida desde a base do epitélio e extensão $\leq 7\text{mm}$. Envolvimento do espaço vascular, venoso ou linfático, não altera a classificação
Ia1	Invasão do estroma $\leq 3\text{mm}$ em profundidade e $\leq 7\text{mm}$ de extensão
Ia2	Invasão do estroma $> 3\text{mm}$ e $\leq 5\text{mm}$ em profundidade e $\leq 7\text{mm}$ de extensão
Ib	Lesões clinicamente visíveis, mas limitadas ao colo do útero ou doença microscópica acima do estadio Ia
Ib1	Lesões clinicamente $\leq 4\text{cm}$ na sua maior dimensão
Ib2	Lesões clinicamente $> 4\text{cm}$ na sua maior dimensão
II	Carcinoma com invasão para além do útero, mas não atingindo a parede pélvica ou o 1/3 inferior da vagina
Ila	Sem invasão dos paramétrios
Ila1	Lesão clinicamente visível $\leq 4\text{cm}$ na sua maior dimensão
Ila2	Lesões clinicamente $> 4\text{cm}$ na sua maior dimensão
Ilb	Com invasão dos paramétrios
III	Extensão para a parede pélvica e/ou envolvimento do 1/3 inferior da vagina e/ou hidronefrose ou rim não funcionante
IIla	Envolvimento do 1/3 inferior da vagina sem envolvimento da parede pélvica
IIlb	Extensão para a parede pélvica e/ou hidronefrose ou rim não operacional. Metástases nos nódulos linfáticos regionais
IV	Extensão para além da pélvis ou envolvimento (confirmado por biópsia) da mucosa da bexiga ou reto
IVa	Envolvimento de órgãos adjacentes
IVb	Envolvimento de órgãos à distância incluindo a disseminação peritoneal, o envolvimento de supraclavicular, o mediastino, ou os gânglios linfáticos paraaórticos, pulmão, fígado, ou osso

*** O envolvimento do espaço linfovascular deve ser sempre referido, mas não altera o estadio.

Estudos moleculares e epidemiológicos demonstraram inequivocamente que a grande maioria dos casos de CCU são causados por infeções persistentes com alguns tipos de HPV. Globalmente, entre as mulheres, os cinco tipos de HPV mais comuns são o HPV 16 (3,2%), HPV 18 (1,4%), HPV 52 (0,9%), HPV 31 (0,8 %) e o HPV 58 (0,7%). Na Europa, o

HPV 16, 31 e 18 são os subtipos mais frequentes, com uma prevalência de 4,8%, 2,3% e 0,9%, respetivamente (15). Na população portuguesa, o HPV 16 apresenta uma elevada prevalência em lesões intra-epiteliais e no CCU (16). Por histologia, o HPV 16 está presente numa maior proporção nos carcinomas de células escamosas do que nos adenocarcinomas, sendo o inverso no caso do HPV 18 (10-12).

Como prevenção primária, existem elevadas expectativas de que as vacinas vão proteger as mulheres contra as estirpes mais comuns de infeções por HPV (tipo 16 e 18), que causam cerca de 70% dos cancros do colo do útero (7, 16, 17). Em Portugal, existem duas vacinas profiláticas disponíveis no mercado para a proteção contra os subtipos de HPV mais frequentes: a *Gardasil* (*Merck and Company*) e a *Cervarix* (*GlaxoSmithKline*) (7). Vários estudos indicam que as vacinas contra o HPV são seguras e que a sua utilização reduz em cerca de 70% a probabilidade de desenvolver um CCU (18, 19). É importante mencionar que, mesmo as mulheres vacinadas devem continuar a ser rastreadas, dado que as vacinas não protegem contra todos os tipos de HPV que causam o CCU e, possivelmente, podem não proteger contra infeções já estabelecidas. A prevenção secundária através da citologia cervico-vaginal é o método preferencial de rastreio, pelo que envolve um procedimento simples e é o mais rentável (10, 20). De acordo com as normas da Direção Geral de Saúde, deve ser assegurado o rastreio do cancro do colo do útero a todas as mulheres entre os 25 e os 64 anos de idade (21).

2.1. Fatores de risco

Atualmente são vários os fatores de risco conhecidos que estão relacionados com o desenvolvimento do CCU, mas a infeção provocada pelos tipos oncogénicos do HPV é o principal fator de risco (7). A infeção pelo HPV é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns, sendo a maioria delas assintomáticas e eficientemente controladas pelo sistema imunitário (16, 19). Por conseguinte, o resultado da infeção por HPV é variável, sendo que a infeção é normalmente transitória e a sua resolução completa é alcançada comumente entre 12 a 24 meses. No entanto, se a infeção persistir com um ou mais tipos de HPV oncogénico, esta pode levar ao aparecimento de lesões intra-epiteliais, que podem progredir para displasia de alto grau ou para carcinoma invasivo, em casos mais graves (19, 22). A prevalência da infeção por todos os tipos de HPV varia significativamente de acordo com a localização geográfica: 21% na África, 12% na América, 9% na Ásia e 14% na Europa (7, 15).

A infecção pelo HPV é necessária, no entanto não é suficiente para o desenvolvimento do cancro do colo do útero, o que implica o envolvimento de outros fatores relacionados com o hospedeiro (23). O número de parceiros sexuais ao longo da vida é considerado um dos principais fatores de risco para a infecção por HPV e pode estar associado a um elevado risco de desenvolver lesões pré-tumorais e CCU (19, 24). De igual forma, existem fortes evidências para considerar que o uso de contraceptivos orais a longo termo pode ser um importante fator de risco para esta neoplasia (24). Nos últimos anos, verificou-se que existem associações entre o CCU e fatores como: a classe social baixa, a multiparidade, as fumadoras, o início precoce da atividade sexual e a não utilização de barreiras locais de contágio de doenças sexualmente transmissíveis (13, 25, 26). Uma associação entre o tabaco e o CCU tem sido estabelecida, principalmente devido às substâncias tóxicas do fumo do tabaco que podem introduzir danos no DNA e terem um efeito negativo direto nas células do colo do útero (13).

2.2. Tratamento

A decisão da abordagem terapêutica deve ser baseada nas características das doentes (idade, nível de hemoglobina no sangue), assim como nas características do tumor (estadio, envolvimento dos nódulos linfáticos, tamanho do tumor, tipo histológico e metastização ganglionar) (27). O tratamento desta neoplasia maligna tem-se modificado ao longo do tempo e depende essencialmente da extensão da doença.

Em estadios iniciais, a cirurgia (CR) e a radioterapia (RT) são igualmente efetivas para lesões com um pequeno volume. As lesões pré-invasivas são geralmente tratadas recorrendo a uma excisão local (excisão ou conização cervical) ou ablação (ablação a laser ou crioterapia). A histerectomia pode ser considerada no tratamento de lesões cervicais pré-invasivas, no caso das doentes com uma displasia de alto grau e sem nenhum plano de fertilidade. De modo geral, a CR é o tratamento selecionado para as doentes de estadio Ia, Ib e IIa, sendo a sua extensão (histerectomia simples ou radical) dependente da fase em que se deteta a doença. Em fases avançadas, as doentes são tratadas com RT, porém, em alguns casos, nomeadamente quando os tumores não são clinicamente operáveis, este também é um tratamento recomendado para os estadios Ia-IIa. No que refere ao tratamento de lesões inoperáveis, a quimioradioterapia (QRT) é a terapêutica preferencial (9). Estudos randomizados mostram que a combinação de modalidades terapêuticas, incluindo QT com cisplatina, com ou sem 5-fluorouracil (5-FU) e RT, melhora a sobrevivência global, a sobrevivência livre de progressão da doença e as taxas de

recorrência em doentes com CCU localmente avançado. Na tabela 2 encontra-se descrito as várias abordagens terapêuticas para o CCU por estadio.

Tabela 2 – Abordagens terapêuticas para o cancro do colo do útero (Adaptado de: (27))

Lesão pré-invasiva	Conização
	Procedimento de excisão eletrocirúrgica (<i>Loop Electrosurgical Excision Procedure – LEEP</i>)
	Ablação a laser
	Crioterapia
Estadio Ia	Histerectomia simples
	Histerectomia ou Conização
Estadio Ib1	Alternativa: braquiterapia isolada de alta ou baixa taxa de dose
	Histerectomia radical mais dissecação dos nódulos linfáticos pélvicos
Estadio Ib2, IIa e IIb	Radioterapia e braquiterapia
	Quimiorradioterapia concomitante baseada em cisplatina
Estadio IIIa	Radioterapia e braquiterapia
	Quimiorradioterapia concomitante baseada em cisplatina
Estadio IIIb e Iva	Radioterapia e braquiterapia
	Quimiorradioterapia concomitante baseada em cisplatina
Estadio IVb	Quimioterapia

2.2.1. Cirurgia

A cirurgia (CR) por si só é uma modalidade terapêutica com intuito curativo para a fase inicial do CCU (estadio Ia1-II). Para o estadio Ia1, uma histerectomia extrafascial simples pode ser realizada. A conização, quando realizada e seguida por um acompanhamento rigoroso, pode ser considerada uma opção para a manutenção da fertilidade. Uma taxa de sobrevivência global de aproximadamente 100% pode ser esperada após um tratamento definitivo do estadio Ia de CCU. Para tumores de estadio Ia2-Ib1, a histerectomia radical ou radical modificada com a dissecação de nódulos linfáticos pélvicos é uma opção

terapêutica. A cirurgia limitada no estadio Ia2 não é recomendada, pois a probabilidade de existir um envolvimento ganglionar linfático regional é de aproximadamente 5% a 10%.

2.2.2. Radioterapia

A radioterapia (RT) é o tratamento utilizado em doentes com estadio inicial, com neoplasias clinicamente inoperáveis ou em doentes que recusam a CR. Para o estadio Ia1, a braquiterapia (BT) intracavitária pode ser usada isoladamente. Durante a fase Ia2 ou Ib1, após a BT, deve-se considerar irradiar a zona pélvica, com técnicas de RT externa (9). Os resultados associados à RT no tratamento dos estadios avançados foram fracos, dado que as taxas de sobrevivência aos 5 anos são de 30-55% para o estadio IIIb e de 4-20% para o estadio IVa (14, 28, 29). A RT adjuvante é muitas vezes indicada após a CR e o resultado é comparável ao tratamento com radiação, na ordem dos 90% aos 5 anos após o tratamento (9). No entanto, espera-se um aumento da toxicidade nas doentes tratadas com CR e RT adjuvante em comparação com as que são tratadas apenas com radiação. A combinação da RT externa com a BT intracavitária é considerada um dos tratamentos *standard* para o cancro do de colo do útero (29). A BT tem a vantagem de administrar uma dose de radiação mais elevada no tumor e menor nos órgãos adjacentes à lesão, tais como a bexiga e o reto, proporcionando um aumento do controlo local e minimizando os danos nos tecidos normais.

2.2.3. Quimioterapia

Não existem muitas evidências que suportem o uso da quimioterapia (QT) isoladamente após a CR (9). Porém, o papel da QT adjuvante tem sido explorado em vários estudos ou ensaios clínicos no CCU localmente avançado ou metastizado (30). Assim, ao longo das duas últimas décadas, vários estudos mostraram que a QT neoadjuvante, seguida de um processo cirúrgico, permite alcançar resultados muito satisfatórios em fases mais avançadas da doença. O potencial benefício desta estratégia terapêutica inclui uma redução do volume tumoral, um aumento da ressecabilidade, um controlo da doença micrometastática e uma melhoria da qualidade de vida das doentes (31).

2.2.4. Quimioradioterapia

A quimioradioterapia (QRT) é considerada uma terapia *standard* para o tratamento do cancro do colo do útero (CCU) em estadios avançados e localmente avançados (29, 32-34).

Usualmente, a RT é usada para tratar o tumor primário enquanto a QT é adicionada para controlar a disseminação sistêmica do tumor (35). Desta forma, a QT é administrada concomitantemente à RT, uma vez que a QT funciona como um radiosensibilizador que aumenta o efeito da radiação, devido ao uso de um agente citotóxico, como a cisplatina, que atua diretamente no local das células tumorais e nas metástases subclínicas existentes à distância, para além da área irradiada (28, 30, 32, 33, 35). A sensibilização ocorre devido à complementação das terapias, pelo que afetam diferentes fases do ciclo celular, simultaneamente. É importante referir, que a QT pode aumentar o número de células tumorais eliminadas, aumentando o declive da curva dose-resposta da RT, por mecanismos que incluem a citotoxicidade direta no tumor, a sincronização do ciclo celular do tumor e/ou a inibição da reparação dos danos subletais (28, 32).

2.3. Efeitos secundários

Os efeitos secundários agudos da RT à zona da pélvis e da QT são bem conhecidos e geralmente reversíveis (32). As doentes com CCU localmente avançado e tratadas com QRT concomitante manifestam frequentemente toxicidades agudas que incluem alterações hematológicas (leucopenia, anemia, neutropenia), distúrbios gastrintestinais (náuseas, vômitos, diarreia), distúrbios vulvovaginais e infeções do trato urinário (28, 30, 32, 34-38). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, estes sintomas agudos de grau 3 e 4 afetam cerca de 21,6% das doentes tratadas. Quanto aos efeitos da toxicidade tardia no reto, trato urinário e na vagina, que se manifestaram em 1,6% das doentes, os mais frequentes envolvem o sangramento retal, estenose ou fístula reto-vaginal, hematúria e complicações intestinais que requerem CR (32, 36, 37, 39-41). É importante referir que existe falta de informação sobre as toxicidades tardias, porém, os poucos estudos disponíveis indicam um aumento dos efeitos da radiação, a longo prazo (35). As terapias adjuvantes melhoram a sobrevivência, mas estão associadas a toxicidades e efeitos adversos, principalmente ao nível do reto-sigmoide, entre os quais destaca-se a proctite, tenesmo, diarreia, fístula, estenose e ulceração (40, 41). Em aproximadamente um terço das doentes, a toxicidade no interior da bexiga, nomeadamente, as cistites, fístulas,

ulcerações e a bexiga contraída são efeitos que também podem ocorrer. A toxicidade dérmica local, tal como o edema, eritema, pigmentação, fibrose e a ulceração são relatados em 20% dos casos (30, 32, 34, 37, 40). As toxicidades ginecológicas, como a vaginite, secura, estenose, dispareunia, necrose ou ulceração do colo do útero, perfuração do útero, hematometra, necrose do útero e as infecções do útero ocorrem em cerca de 10% dos casos (40). A adição da QT com a RT é uma abordagem terapêutica mais tóxica e pode aumentar a incidência das toxicidades crônicas tardias (14, 32).

3. Reparação do DNA e cancro

Estima-se que, por dia, ocorrem dezenas de milhares de eventos que danificam o DNA das aproximadamente 10^{13} células existentes no corpo humano (42). Os danos no DNA podem interferir com os processos celulares essenciais, tais como a transcrição ou a replicação do DNA e podem comprometer a viabilidade celular. Contudo, de modo a assegurar a precisa replicação do genoma e a contínua vigilância da sua integridade, as células iniciam uma cascata de eventos altamente coordenada, conhecida como a resposta celular aos danos no DNA (DDR) (42, 43).

Este sistema de resposta aos danos inclui vários componentes celulares, como os sensores dos danos e os efetores da resposta aos danos. Os sensores consistem num grupo de proteínas (ATR e ATM) que detetam e controlam a presença de danos. Em seguida, estas proteínas vão sinalizar o dano até às principais vias efetoras, que em conjunto vão determinar o melhor resultado para a célula. Essas vias efetoras incluem: a via da morte celular programada (apoptose), as vias de reparação do DNA, que reparam fisicamente as quebras na cadeia do DNA e as vias que causam bloqueios temporários ou permanentes no progresso das células através do ciclo celular (*Checkpoints*). Portanto, a ativação destas múltiplas vias celulares e bioquímicas é um fator crucial para a sobrevivência celular e a prevenção da carcinogénese (Figura 3).

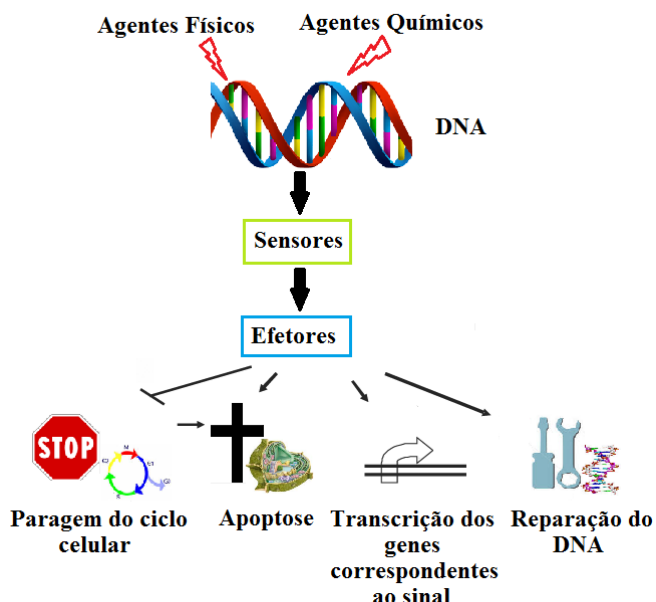


Figura 3 - Esquema representativo dos mecanismos de resposta aos danos no DNA (Adaptado de: (35))

3.1. Tipos de danos

O genoma é inerentemente instável e está constantemente exposto a uma ampla variedade de agentes genotóxicos, tanto de fontes endógenas como exógenas (42, 44). Em geral, a grande maioria das alterações causadas no DNA são de origem endógena, tais como as espécies reativas de oxigénio (ROS), produtos dos metabolitos reativos endógenos e a instabilidade química do DNA. Relativamente aos agentes exógenos ou ambientais, destaca-se a luz ultravioleta proveniente do sol, a radiação ionizante (artificial ou natural), os vírus e os agentes químicos terapêuticos usados nos tratamentos oncológicos (42, 45, 46).

Especificamente, quando as células são submetidas a tratamentos de RT, os principais danos que ocorrem são as ROS, quebras na cadeia de DNA, sendo as quebras de cadeia dupla as mais prejudiciais. Existem dois mecanismos pelos quais a radiação ionizante (RI) pode exercer o seu efeito citotóxico sobre as células, nomeadamente, pelos mecanismos direto e indireto (Figura 4) (35, 42, 44, 47-51).

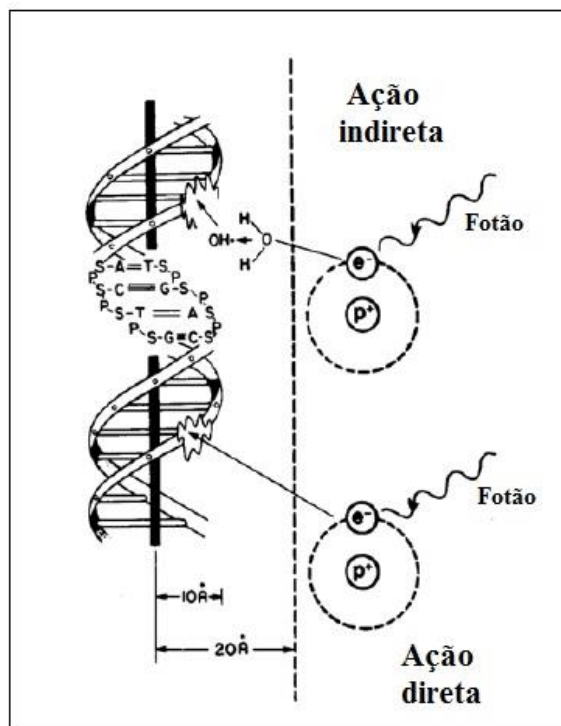


Figura 4 - Efeito da radiação ionizante (Adaptado de: (27))

O mecanismo direto consiste na deposição direta de energia no DNA e ocorre quando a radiação interage com os átomos da molécula de DNA ou com outros componentes celulares essenciais para a sobrevivência da célula, provocando uma alteração química do DNA através da sua ionização. Por sua vez, o mecanismo indireto baseia-se nas reações com as moléculas de água, que constituem a maior parte do volume celular. De seguida, ocorre a sua ionização (radiólise), dando origem a espécies reativas de oxigénio, que podem ser espécies moleculares como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radicais livres, como o radical hidroxilo (OH^\bullet), que poderão danificar o DNA (44, 47).

Relativamente à QT, os fármacos mais usados são os platinos, descobertos pela primeira vez contendo a cis-diamina-dicloroplatina (II), mais comumente conhecida por cisplatina. Estes fármacos normalmente causam danos no DNA, inicialmente sob a forma de monoadutos e, seguidamente, sob a forma de ligações cruzadas intracadeia e intercadeias que rompem a estrutura da molécula de DNA, induzindo alterações na hélice (42, 52-56). Consequentemente ativam diferentes vias de transdução de sinal, que bloqueiam processos celulares, tais como a replicação e a transcrição (53, 56).

Relativamente aos tratamentos com QRT, nomeadamente quando se recorre à cisplatina associada à RT, é notável um aumento do número das quebras de cadeia do DNA induzidas pela radiação, as quais surgem devido à conversão das quebras de cadeia

simples para o dobro das quebras de cadeia dupla, durante a reparação dos adutos de platinos. Por sua vez, esta conversão ou a inibição dos mecanismos de reparação, tem como efeito o aumento do declive da curva de sobrevivência da radiação e proporciona uma melhor resposta ao tratamento (35). O mecanismo de ação mais importante da cisplatina consiste no reconhecimento do dano no DNA induzido pela mesma, que desencadeia a morte celular (57, 58).

3.2. Vias de reparação do DNA

Atualmente, sabe-se que o DNA pode estar sujeito a um grande número de danos que alteram a sua conformação/atividade, pelo que a resposta da célula face a estes danos e a sua capacidade para manter a estabilidade genómica, apresentam um papel crucial tanto no desenvolvimento do cancro, como na resposta à terapia (44). Neste sentido, um dos principais obstáculos à eficácia da terapia é o desenvolvimento de fenótipos de resistência aos fármacos por parte dos doentes. Esta resistência pode ser intrínseca ou adquirida e pode ser mediada por fatores internos ou externos à célula tumoral ou da própria membrana, sendo que a resistência é multifatorial (56). A resistência dos tumores às terapias com platinos pode ocorrer por três mecanismos diferentes: pela perda da sinalização apoptótica após o dano ter ocorrido, pela reparação do DNA/remoção dos danos ou pela tolerância aos danos (57).

O reconhecimento dos danos no DNA é uma etapa crucial e, uma vez detetados podem desencadear várias respostas celulares, de modo a impedir a replicação desses erros genéticos (49). Ao longo das diferentes fases do ciclo celular, existem vários pontos de controlo (*checkpoints*) capazes de monitorizar a progressão das células e, apesar de serem pontos de verificação distintos, todos eles respondem a danos no DNA e partilham diversas proteínas. A ativação destes pontos de controlo e o recrutamento das proteínas para a resposta aos danos no DNA depende do tipo de danos (48). A nível celular, os *checkpoints* podem ser ativados para bloquear o ciclo celular, para regular a transcrição de forma a compensar o dano ou para induzir a apoptose. Em alternativa, o dano pode ser reparado ao nível do DNA, permitindo assim a replicação da célula como previsto. Deste modo, consoante o tipo de dano ocorre a atuação de mecanismos de reparação específicos. Estas vias complexas encontram-se em constante funcionamento nas células e envolvem numerosas moléculas que têm evoluído para executar essa reparação (49). A nível molecular, a eliminação dos danos provocados pela RI ou pelos agentes químicos desencadeia a ativação de vários mecanismos de reparação, tais como, a reparação de

excisão de bases (BER), excisão de nucleótidos (NER), recombinação homóloga (HR), união terminal não homóloga (NHEJ) e a reparação de erros de emparelhamento ("*Mismatch*" - MMR) (13, 35, 42, 44).

3.2.1. Reparação por excisão de nucleótidos (NER)

A via de reparação por excisão de nucleótidos (NER) é um sistema de reparação versátil e altamente conservador do DNA que repara inúmeros danos, especialmente modificações de base que distorcem a estrutura helicoidal normal do DNA (56, 57, 59-61). Esta via de reparação é importante para reparar os danos volumosos, as espécies reativas de oxigénio (ROS), as ligações cruzadas intracadeia e os adutos de DNA formados pela luz ultravioleta e por alguns agentes terapêuticos, como a cisplatina (42, 52, 53, 55, 59, 62).

A via NER é complexa e requer cerca de 30 proteínas diferentes para permitir que o processo de reparação dos danos ocorra eficazmente (42, 59, 62-64). De uma forma geral, este mecanismo de reparação envolve, pelo menos, quatro passos, nomeadamente o reconhecimento do dano, a abertura da hélice do DNA em torno do local danificado, a excisão de um curto segmento da cadeia simples do DNA que envolve o dano e a síntese da reparação sequencial e da cadeia de ligação (Figura 5) (42, 54, 56, 57, 59-61, 65).

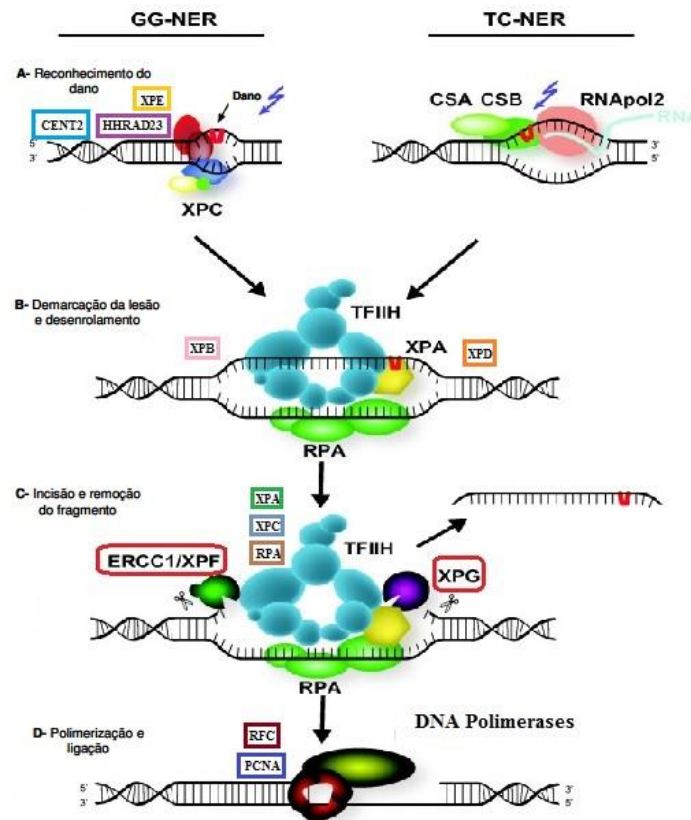


Figura 5 - Esquema representativo da via de reparação por excisão de nucleótidos (NER) (Adaptado de: (44, 49))

É importante referir que o sistema de reparação NER é composto por uma via principal denominada por *Global Genome NER* (GG-NER), a qual elimina danos do DNA existentes por todo o genoma. Porém, existe uma sub-via designada por *Transcription-Coupled NER* (TC-NER), que consiste na reparação acoplada à transcrição, ou seja, repara preferencialmente danos localizados na cadeia de codificação dos genes ativamente transcritos (42, 54, 57, 59, 67). Esta via TC-NER atua rapidamente para assegurar que a transcrição dos genes possa ser realizada corretamente. Em contraste, a via GG-NER repara os danos existentes no genoma mais lentamente, prevenindo a passagem de mutações de geração em geração, assegurando desta forma a manutenção da integridade do genoma (66, 68). Ambas as vias são funcionalmente semelhantes, exceto na etapa inicial do reconhecimento do dano (42, 69).

Na via GG-NER, o principal fator de reconhecimento dos danos é o complexo de proteínas *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C* (XPC), HRAD23B, Centrin 2, (XPC/HRAD23B/CENT2) (42, 64, 66, 70). Em contraste, o reconhecimento dos danos pela via TC-NER é iniciado quando uma RNA polimerase II (RNAPII) for retida no DNA, após encontrar um local danificado. Subsequentemente, este mecanismo necessita de proteínas

específicas complementares, a *Cockayne Syndrome Type A* (CSA) e a *Cockayne Syndrome Type B* (CSB), que facilitam a eventual remoção do dano e o reinício da transcrição, para além de assegurar a remoção e degradação da polimerase por ubiquitinação (59, 63, 64, 69). Após o reconhecimento dos danos, ambas as vias GG-NER e TC-NER continuam o processo através das reações comuns da via NER “central”. Inicialmente, quer o complexo XPC e HRAD23B na via GG-NER, quer a CSA e a CSB na via TC-NER, recrutam múltiplas subunidades (complexo de 10 proteínas) e múltiplos fatores de transcrição funcionais (TFIIH) para o local do dano (59, 69). Posteriormente, duas subunidades do TFIIH com a atividade de helicases dependentes de ATP, *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group B* (XPB) e *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group D* (XPD) promovem o desenrolamento assimétrico da hélice do DNA, de modo a formar um *loop* de aproximadamente 30 nucleótidos que permite flanquear o dano. A proteína XPB desenrola o DNA em cerca de 5 nucleótidos na direção 3'→5' e a XPD desenrola na direção oposta cerca de 22 nucleótidos. Este desenrolamento inicial permite o acesso da *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group A* (XPA) à região danificada, o que fornece um segundo nível de reconhecimento dos danos, além de garantir que o DNA não degradado não é submetido a uma reparação da excisão (59, 64, 66, 71-73). A ligação da XPA é acompanhada pela proteína de replicação A (RPA), que se liga à cadeia simples do DNA oposta à danificada e permite a completa extensão e a subsequente estabilização e formação do complexo da pré-incisão (42, 59, 69, 73). Seguidamente, duas endonucleases de estruturas específicas, *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group G* (XPG) e *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group F – Excision Repair Cross-Complementation Group 1* (XPF-ERCC1) clivam o DNA nas posições 3' e 5' respectivamente, conduzindo a uma excisão de um fragmento de oligonucleótidos de cerca de 24-30 nucleótidos, que contém o dano (54, 62, 63, 67). A proteína XPG executa uma incisão inicial de 2-9 nucleótidos do dano na posição 3', enquanto que o complexo XPF-ERCC1 realiza a segunda incisão, 16-25 nucleotídeos do dano na posição 5' (61, 64). A XPF contém o domínio catalítico da nuclease, ao passo que o gene *ERCC1* é necessário para a ligação ao DNA e para a estabilização da XPF (74). Após as incisões no DNA, é gerado um fragmento de oligonucleótidos que é excisado. Posteriormente, a DNA polimerase δ ou ϵ utiliza a cadeia não danificada como molde para ressintetizar a falha criada na cadeia com o dano, com a cooperação do fator de replicação C (RFC) e do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (42, 43, 59, 66, 69). Por último, a DNA ligase une os fragmentos e completa o processo da via NER (42, 69, 71, 72). Tanto a via GG-NER, como a via TC-NER parecem funcionar independentemente do ciclo celular (59).

Várias evidências apontam para que um déficit na via GG-NER promove a carcinogénese e um déficit na via TC-NER parece estar associado à apoptose excessiva e ao envelhecimento acelerado dos fenótipos (75).

3.2.1.1. *ERCC1*

O gene *Excision Repair Cross-Complementation Group 1 (ERCC1)* encontra-se localizado no cromossoma 19q13.32, compreende 12 exões e codifica uma proteína de reparação do DNA com 297 aminoácidos, denominada por ERCC1. Este gene foi descoberto pela primeira vez na década de 1990, por ser mais preditivo da resposta à cisplatina do que a maioria dos outros genes envolvidos na via NER (Figura 6) (57, 76, 77).

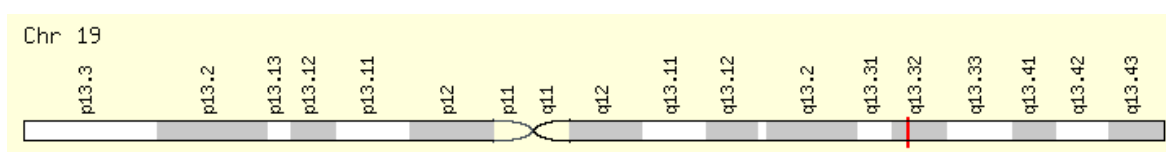


Figura 6 - Localização do gene *ERCC1* (Obtido em: (78))

Considera-se que o *ERCC1* é um dos genes de reparação do DNA mais importantes e exerce um papel essencial na via NER, que é o sistema principal para reparar uma grande variedade de danos do DNA, nomeadamente adutos volumosos, ligações cruzadas, danos oxidativos no DNA, dímeros timidina e danos alquilantes, como foi mencionado anteriormente (13, 76, 77, 79-81). Além disso, apresenta um papel importante na reparação dos danos de cadeia dupla (2, 63, 74). Sabe-se que na via NER, o gene *ERCC1* forma um heterodímero com a XPF, permitindo a incisão da cadeia danificada na extremidade 5' (2, 74).

Nos últimos anos, este gene tem sido alvo de estudo crescente devido à relação entre a sua expressão e a resistência aos platinos (53, 57, 60). Existem vários fatores genéticos que podem contribuir para a resistência das células tumorais à cisplatina. Desta forma, alterações na expressão do gene *ERCC1* têm sido amplamente estudadas no contexto da resistência à cisplatina em vários tipos de tumores, nomeadamente no cancro testicular, colorretal, gástrico, ovário, esôfago, cabeça e pescoço, mama, melanoma, bexiga, pâncreas e pulmão (31, 56-58, 82-100). A subexpressão do complexo XPF-ERCC1 parece diminuir significativamente a viabilidade celular, que se correlaciona com uma menor

capacidade de reparação do DNA e, conseqüentemente, com uma maior sensibilidade das células aos fármacos (52, 101). Neste sentido, este gene é um dos biomarcadores preditivos da resposta à quimioradioterapia (QRT) mais promissor, dado que a sua expressão está associada aos mecanismos de reparação da RI e aos mecanismos de resistência celular à cisplatina (76, 79, 95, 102, 103). Adicionalmente, vários estudos epidemiológicos demonstram uma possível associação deste gene com o risco/suscetibilidade de desenvolver cancro (2, 49, 77, 94).

Até ao momento, alguns estudos têm sido realizados com o objetivo de perceber se a expressão do mRNA do *ERCC1* na fase de pré-tratamento pode funcionar como um marcador molecular clinicamente relevante, com valor de prognóstico ou preditivo para a sensibilidade à cisplatina, em células tumorais do colo do útero. Deste modo, tem sido demonstrado que as células tumorais do CCU localmente avançado que apresentam uma elevada expressão de mRNA do *ERCC1* são resistentes à QT à base de platinos (cisplatina) (33, 81, 94, 104). Esta relação pode ser atribuída ao aumento da remoção dos adutos de DNA, induzidos pelos platinos, pela via NER. Além disso, alterações na expressão do gene *ERCC1* parecem também estar associadas com a resposta à RT, embora esta relação esteja ainda pouco clarificada. Estudos com linhas celulares de mamíferos com deficiências no *ERCC1* demonstraram uma sensibilidade aumentada à RI (101). Contrariamente, foi também verificado que uma baixa expressão do *ERCC1* está associada a uma pior sobrevivência em doentes com CCU tratados apenas com RT (2, 81).

Neste sentido, a racionalização do complexo XPF-ERCC1 como um alvo molecular importante na QT/RT poderá ser uma abordagem terapêutica promissora, dado que desta forma será possível diminuir os níveis do complexo XPF-ERCC1, potenciando a citotoxicidade da cisplatina e da RI e, conseqüentemente, melhorar as taxas de resposta aos tratamentos (52).

3.2.2. Reparação por Recombinação Homóloga (HR)

O mecanismo de reparação por recombinação homóloga (HR) constitui uma via fundamental para manter a estabilidade genómica, através de uma correta reparação e replicação do DNA (105-108). Esta via envolve um processo de troca genética entre sequências de DNA homólogas, ou seja, existe uma transferência de informação genética de uma molécula de DNA para outra e/ou uma troca recíproca de fragmentos de DNA entre sequências homólogas (109, 110). Usualmente, o processo de recombinação ocorre entre

sequências localizadas em posições semelhantes nos cromossomos homólogos ou cromátídeos irmãos (111). Deste modo, a HR é uma via predominantemente livre de erros, dado que utiliza cópias adicionais de sequências de DNA homólogas como molde para a reparação das cadeias danificadas (112). Apesar deste mecanismo de reparação estar associado a um procedimento lento, possui uma elevada fiabilidade e intervém nas quebras de cadeia dupla do DNA (DSB's), ligações cruzadas intercadeias e adutos, sendo que as DSB's são as mais prejudiciais, pelo facto de que a reparação intrínseca é mais complexa quando comparada com a reparação de outros tipos de danos no DNA (109, 110, 113, 114).

Na HR, existem pelo menos três vias diferentes: a via clássica, denominada por *Double-Strand Break Repair* (DSBR), a *Synthesis-Dependent Strand Annealing* (SDSA) e a *Break-Induced Replication* (BIR) (109).

Na maioria dos modelos, a HR pode ser conceitualmente dividida em pelo menos seis fases: a iniciação, que envolve a formação de uma DSB, seguida pela formação de uma cadeia simples de DNA; a pré-sinapse que envolve a ativação da cadeia simples, de modo a permitir a pesquisa da homologia; a busca da homologia e o emparelhamento do DNA homólogo; a troca de cadeias, o que leva à formação do DNA de cadeia dupla; a formação da junção *Holliday* e a migração do ramo; e a resolução das junções de *Holliday*, para se obter os produtos recombinantes (115).

A deteção dos danos no DNA pela via HR é realizada através do complexo Mre11-RAD50-Nbs1 (MRN), o qual promove a ativação do gene ATM (Figura 7) (105, 109). Este complexo concentra-se nos locais das DSB's e tem a atividade de uma exonuclease e endonuclease (70, 111, 116). A exonuclease hExo1 está envolvida na ressecção da extremidade 5', e atua provavelmente, em conjunto com o complexo MRN (109, 114). Assim, supõe-se que o passo inicial da HR consiste na ressecção do DNA no sentido 5' para 3' por uma exonuclease, de modo a originar uma saliência na extremidade 3' da cadeia simples do DNA (105, 110). De seguida, a proteína RPA heterotrimérica liga-se à ssDNA estabilizando as regiões da ssDNA geradas durante a replicação, reparação e recombinação do DNA. Assim, o gene *RAD51* pode ter acesso ao complexo ssDNA-RPA, dado que a ssDNA se encontra revestida pela RPA, que funciona como um alvo para a ligação da proteína RAD52, e consequentemente, a RAD51 interage com a RAD52 (107, 112, 114). A proteína RAD51 forma um filamento nucleoproteico nas regiões de cadeia simples e catalisa a procura das sequências homólogas, a troca e emparelhamento de cadeias do DNA, juntamente com os seus parálogos (*RAD51B*, *RAD51C*, *Rad51D*, *XRCC2*, *XRCC3*), *RAD52* e *RAD54* (107-109, 111) (105, 113). Por fim, a invasão da cadeia e a migração

envolve a formação de uma estrutura denominada por junção de *Holliday*. Seguidamente, ocorre a síntese do DNA mediada por uma DNA polimerase δ e a resolução da junção de *Holliday*.

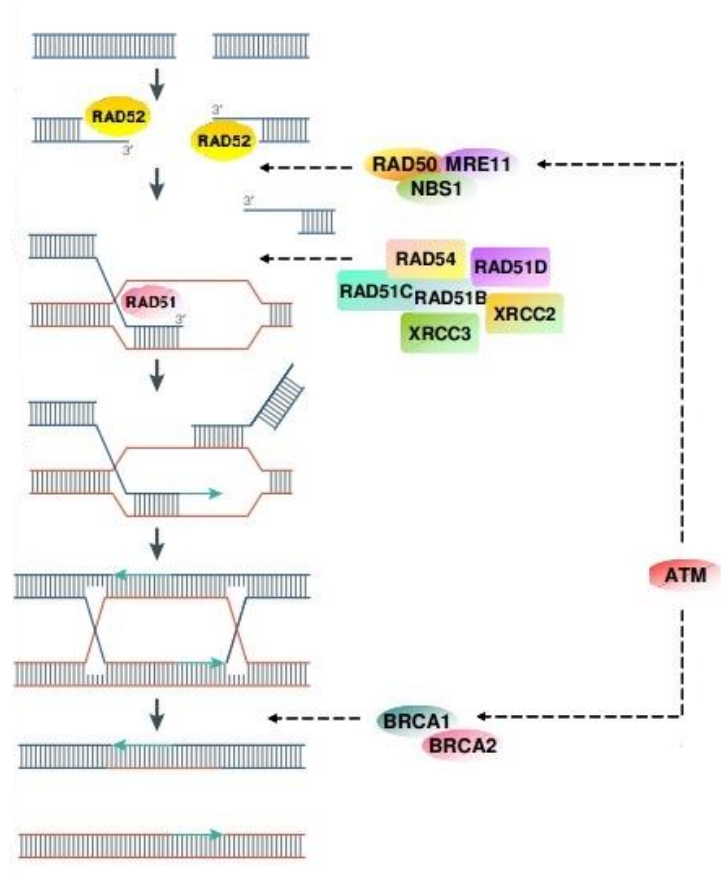


Figura 7 - Esquema de reparação de danos de cadeia dupla do DNA pela via recombinação homóloga (Adaptado de: (44, 49, 117))

3.2.2.1. XRCC3

O gene *X-Ray Repair Cross-Complementing Protein 3* (XRCC3) está localizado no cromossoma 14q32.3 e codifica uma proteína de reparação que contém 346 aminoácidos, denominada XRCC3 (118-122). Este gene encontra-se envolvido na via da HR e ajuda a manter a estabilidade cromossômica através da reparação dos danos do DNA, nomeadamente as DSB's (Figura 8) (23, 122, 123).

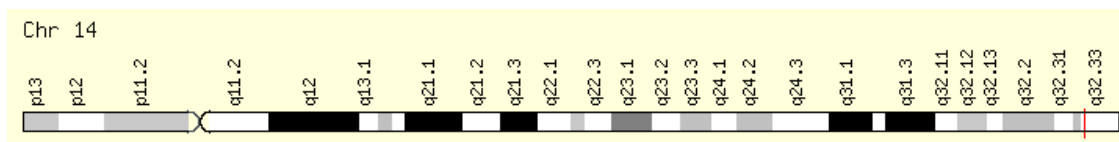


Figura 8 - Localização do gene *XRCC3* (Obtido em:(121))

O gene *XRCC3* pertence a uma família emergente de proteínas relacionadas com a proteína RAD51, que participam na HR (124). Além disso, este gene desempenha um papel importante também na resistência aos agentes terapêuticos que induzem danos no DNA (125). Neste sentido, sabe-se que células com deficiência no gene *XRCC3* são mais sensíveis à cisplatina devido à supressão da HR e ao aumento da instabilidade cromossômica. Estes dados indicam que este gene desempenha um papel preponderante na tumorigênese e na resposta à terapia. No entanto, a influência de alterações na expressão do gene *XRCC3* e seu significado clínico, nomeadamente na resposta terapêutica e no prognóstico dos doentes ainda não se encontram totalmente elucidados (126). Desta forma, é possível mencionar que a expressão deste gene pode ser usada como um biomarcador para o risco de desenvolver cancro, a radiosensibilidade e para prever a resposta ao tratamento.

4. A variabilidade genética e a sua influência na resposta ao tratamento

4.1. Contributo dos polimorfismos genéticos

A heterogeneidade genética relacionada com as neoplasias é importante para compreender a dinâmica da progressão do cancro e da resistência às terapias (127). As alterações nos genes de reparação do DNA podem gerar instabilidade genómica e contribuir para uma diminuição da capacidade de reparação, aumentando consequentemente o risco de desenvolver cancro. Assim, torna-se importante estudar o papel de polimorfismos em genes de reparação na suscetibilidade para o cancro e como fatores preditivos da resposta às terapias. Por definição, polimorfismos são formas alternativas de um gene ou de uma sequência intergénica que tem uma frequência igual ou superior a 1% numa população normal (62, 80, 128, 129). Os polimorfismos podem ser *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP's), *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR's) ou *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP's). Especificamente, os SNP's são o tipo de polimorfismo mais comum, correspondendo a cerca de 90% das variações nucleotídicas conhecidas no genoma humano, onde haverá cerca de 16 milhões

de SNP's que parecem ser responsáveis pela maior parte da variabilidade genética humana interindividual (13, 74, 128, 130). Consistem na substituição estável de um único nucleótido e estima-se que ocorram uma vez em cada 300-2000 pares de bases (bp). Os SNP's podem ocorrer em qualquer região do genoma e os seus efeitos biológicos estão resumidos na figura 9. Deste modo, se os SNP's se localizarem nos exões (regiões não codificantes), estes podem modificar a expressão do aminoácido e, consequentemente, afetar a proteína sintetizada ou podem ser silenciosos, isto é, sem qualquer efeito na expressão do gene em que se encontram. Por outro lado, podem estar localizados em regiões intrónicas (regiões codificantes) e produzir vários efeitos, tais como, afetar a expressão génica, alterar a sequência proteica e até diminuir ou aumentar a expressão de um determinado gene, no caso de se localizem na região do seu promotor (51, 129, 130).

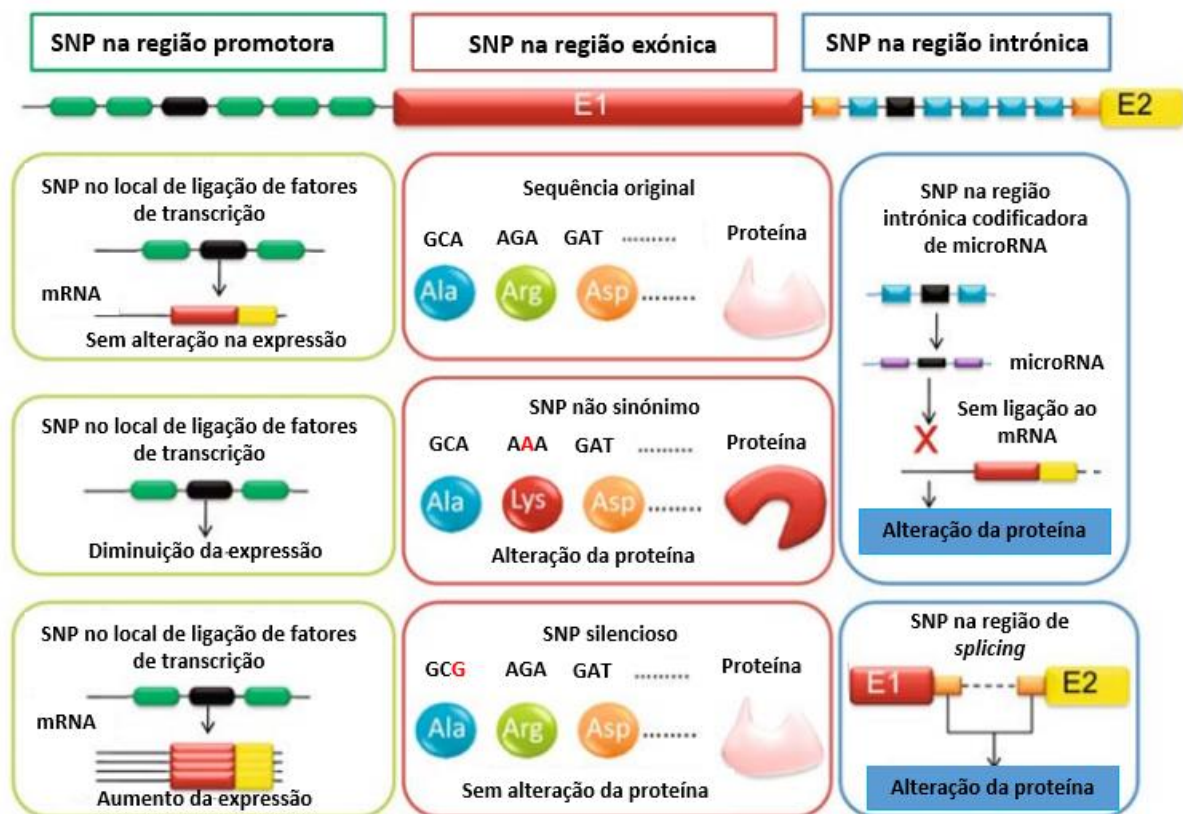


Figura 9 - Localização dos SNP's e os seus efeitos biológicos (Adaptado de: (131))

Devido às diferenças interindividuais nos processos de reparação dos danos, o papel dos polimorfismos associados a genes de reparação do DNA tem vindo a despertar um crescente interesse, uma vez que parecem alterar as propriedades funcionais das enzimas de reparação do DNA e, por conseguinte, influenciar a resposta terapêutica (49, 132). Para

além da necessidade de descobrir novos fármacos, também é importante otimizar os fármacos existentes para minimizar as reações adversas e maximizar a eficácia dos mesmos (133, 134). Devido ao possível efeito da QT sobre a expressão génica, é possível afirmar que os polimorfismos nos genes de reparação do DNA podem influenciar a resposta do tumor à QT à base de platinos (103). Também na RT, as variações interindividuais na resposta à radiação podem ser herdadas face à alteração na expressão do gene induzida por fatores epigenéticos ou devido a determinadas variações nos genes envolvidos no reconhecimento dos danos, na reparação do DNA ou na regulação do ciclo celular (51).

Deste modo, neste trabalho serão estudados dois polimorfismos em genes de reparação associados às principais vias de reparação dos danos causados pela QT e RT.

4.1.1. Polimorfismo *ERCC1 C8092A* (rs321986)

Dada a importância do gene *ERCC1* na via NER, vários estudos têm avaliado o papel de polimorfismos neste gene na suscetibilidade para desenvolver cancro e na resposta à terapia. Um dos polimorfismos mais estudados consiste na substituição de Citosina (C) por uma Adenina (A), na posição 8092 do códon 504 na região 3' não codificada, que corresponde a uma troca de aminoácidos de uma Glutamina (Gln) para uma Lisina (Lys). Quanto ao seu efeito funcional, este polimorfismo parece estar associado com alterações na estabilidade de transcrição do mRNA, nomeadamente na região 3' não codificada e resulta na diminuição dos níveis de expressão do gene *ERCC1* (53, 77, 135-137). Na Europa, a frequência do alelo C é de 75% e do alelo A 25%. Quanto às frequências genótípicas, estas são de 56%, 37% e 7% para o genótipo CC, AA e CA respetivamente (138).

Os polimorfismos neste gene podem contribuir para a suscetibilidade individual associada à carcinogénese, nomeadamente do CCU (2, 135). Recentemente, alguns estudos sugerem que polimorfismos no gene *ERCC1* podem reduzir a reparação do DNA e serem úteis marcadores moleculares para prever a resposta terapêutica e o prognóstico no cancro gástrico, CPNPC, cancro do ovário e carcinoma das células escamosas do esófago (139). No caso do polimorfismo *ERCC1 C8092A*, a limitação na capacidade de reparação parece proporcionar um aumento do risco de desenvolver cancro, um aumento da sobrevivência global, uma melhor resposta terapêutica e uma maior radiosensibilidade (102, 140, 141). Até ao momento, não foi realizado nenhum estudo que tenha avaliado uma possível associação entre este polimorfismo e a resposta terapêutica em doentes com CCU.

4.1.2. Polimorfismo *XRCC3 Thr241Met* (rs861539)

Encontram-se descritos vários polimorfismos no gene *XRCC3*, sendo que um dos mais estudados consiste na substituição de Citosina (C) por uma Timina (T) no codão 241 do exão 7, traduzindo-se numa troca de aminoácido de uma Treonina (Thr) por uma Metionina (Met) (120, 122). Esta alteração não é conservadora e parece estar relacionada com alterações nas funções da estrutura da proteína e desempenhar um importante papel na patogénese do cancro. Na Europa, a frequência alélica da variante menos frequente (alelo T) é de 39% e do alelo C 61%. Relativamente à frequência genotípica distribui-se da seguinte forma: 38%, 45% e 17% para os genótipos Thr/Thr (CC), Thr/Met (CT), e Met/Met (TT), respetivamente (142).

O efeito biológico deste polimorfismo é ainda controverso, no entanto parece que a sua presença pode originar uma redução da capacidade de reparação do DNA e, consequentemente, conferir uma associação positiva com o aumento do risco de numerosas neoplasias malignas como, cancro da mama, pulmão e leucemia mieloide aguda. Todavia, existem alguns estudos contraditórios, nomeadamente no cancro das vias aéreas superiores que está relacionado com uma redução do risco de cancro (120, 143, 144). Outros estudos afirmam não encontrar nenhuma relação entre o polimorfismo *XRCC3 Thr241Met* e o desenvolvimento de cancro (144). Quanto à influência deste polimorfismo na resposta ao tratamento, vários estudos com linhas celulares, demonstraram que elevados níveis de *XRCC3* estão correlacionados com o aumento da resistência aos fármacos (125, 126, 145).

Especificamente para o CCU, a maioria dos estudos são direccionados para tentar esclarecer o potencial papel deste polimorfismo no risco de desenvolver reações adversas da RT, assim como se influencia a radiosensibilidade e a suscetibilidade para desenvolver esta neoplasia. Contudo, até ao momento, os resultados são inconclusivos e contraditórios (26, 120, 123, 146, 147).

II. Objetivos



1. Objetivo geral

Estudar o efeito dos polimorfismos genéticos *ERCC1 C8092A* (rs321986) e *XRCC3 Thr241Met* (rs861539) na evolução clínica de doentes com cancro do colo do útero tratadas com quimiorradioterapia concomitante.

2. Objetivos específicos

- Analisar a frequência dos polimorfismos *ERCC1 C8092A* e *XRCC3 Thr242Met* num grupo de mulheres caucasianas com diagnóstico de cancro do colo do útero, da região norte de Portugal.
- Avaliar a existência de associação entre as variantes genéticas dos genes *ERCC1* e *XRCC3* e a eficácia da resposta à quimiorradioterapia com cisplatina.
- Determinar a influência dos polimorfismos na sobrevivência global e na sobrevivência livre de doença das doentes com cancro colo do útero.
- Avaliar o efeito dos polimorfismos na expressão de toxicidades provenientes da quimioterapia e radioterapia.

III. Materiais e Métodos



1. Caracterização da população

Neste trabalho experimental, foi realizado um estudo de base hospitalar do tipo coorte retrospectivo, incluindo 260 doentes caucasianas diagnosticadas histopatologicamente com cancro do colo do útero (CCU), admitidas no Instituto Português de Oncologia do Porto entre Fevereiro de 2002 e Outubro de 2009 e tratadas concomitantemente com radioterapia e quimioterapia à base de cisplatina. O protocolo de QRT concomitante consistia em administrar semanalmente 40mg/m^2 de cisplatina durante a RT externa. As doentes que participaram neste estudo foram seleccionadas de forma consecutiva segundo os seguintes critérios de inclusão: mulheres com diagnóstico citológico e histológico de cancro do colo do útero, idade maior ou igual a 18 anos, estadio Ib2-IVa e tratadas com QRT concomitante. Os critérios de exclusão definidos foram os seguintes: doentes com cirurgia antes do tratamento, ausência do consentimento informado e incumprimento de algum dos critérios de inclusão.

Todas as amostras biológicas das doentes foram utilizadas com o seu conhecimento e consentimento prévios, após validação de Consentimento Informado, de acordo com a declaração de Helsínquia. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Português de Oncologia do Porto (CES.287 / 014). As características clinico-patológicas das doentes encontram-se sintetizadas na tabela 3 e foram obtidas a partir dos registos médicos.

Tabela 3 - Características clínico-patológicas das doentes com cancro do colo do útero submetidas a quimiorradioterapia com cisplatina

Características	Casos	
	n	%
Idade (anos)		
Mediana, 48.00	260	100
Média \pm DP*, 49.00 \pm 11.50		
Tipo histológico		
Carcinoma das células escamosas	216	83.1
Adenocarcinoma	32	12.3
Carcinoma adenoescamoso	7	2.7
Carcinoma de pequenas células	5	1.9
Estadio (FIGO)		
Ib2	22	8.5
Ila2	10	3.8
Ilb	163	62.7
IIla	5	1.9
IIlb	53	20.4
IVa	7	2.7
Envolvimento ganglionar		
Presença	14	5.4
Ausência	246	94.6
Número de ciclos de Quimioterapia		
Mediana, 6 (1-6)	260	100
Dose total de Radioterapia (Gy)		
Mediana, 80 (45-88)	260	100
Tempo de <i>Follow up</i> (meses)		
Mediana, 63.5 (3-115)	260	100
Tabagismo		
Fumador	35	13.5
Não fumador	160	61.5
Ex-Fumador	2	0.8
Sem informação	63	24.2
Resposta terapêutica		
Completa	197	75.8
Parcial	45	17.3
Persistente/Estável	12	4.6
Progressão	6	2.3

Tabela 3 - Características clínico-patológicas das doentes com cancro do colo do útero submetidas a quimiorradioterapia com cisplatina (continuação)

Características	Casos	
	n	%
ECOG		
0	193	74.2
1	61	23.5
2	1	0.4
Sem informação	5	1.9
Toxicidades		
Anemia		
Presente	115	44.2
Ausente	136	52.3
Sem informação	9	3.5
Neutropenia		
Presente	77	29.6
Ausente	173	66.5
Sem informação	10	3.9
Neutropenia febril		
Presente	5	1.9
Ausente	245	94.2
Sem informação	10	3.9
Trombocitopenia		
Presente	56	21.5
Ausente	194	74.6
Sem informação	10	3.9
Pele (aguda)		
Presente	12	4.6
Ausente	238	91.5
Sem informação	10	3.9
Gastrointestinal (aguda)		
Presente	166	63.8
Ausente	84	32.3
Sem informação	10	3.9
Geniturinário (aguda)		
Presente	88	33.8
Ausente	162	62.3
Sem informação	10	3.9

Tabela 3 - Características clínico-patológicas das doentes com cancro do colo do útero submetidas a quimiorradioterapia com cisplatina (continuação)

Características	Casos	
	n	%
Toxicidades		
Pele (tardia)		
Presente	0	0
Ausente	135	51.9
Sem informação	125	48.1
Gastrointestinal (tardia)		
Presente	54	20.8
Ausente	87	33.4
Sem informação	119	45.8
Geniturinário (tardia)		
Presente	36	13.9
Ausente	101	38.8
Sem informação	123	47.3
*DP – Desvio padrão		

2. Procedimentos laboratoriais

2.1. Extração do DNA genómico

Neste estudo, foram recolhidos cerca de 8mL de sangue venoso periférico de todas as doentes, através de uma técnica padronizada de colheita intravenosa, para tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), para preservação anticoagulante. A partir das células nucleadas do sangue periférico, foi isolado o DNA genómico, através de um Kit comercial de extração da FavorGen®, *FavorPrep™ Genomic DNA Mini Kit* (FABGK® 300) e executou-se o procedimento laboratorial fornecido pelo fabricante. Posteriormente, o DNA isolado foi armazenado a -20°C, para a sua preservação a longo prazo.

Para a extração do DNA recorreu-se ao sistema de colunas de centrifugação, que se baseia na grande afinidade de ligação do DNA à membrana de sílica, que reveste as colunas de centrifugação. Este procedimento é constituído por três fases: a adsorção, a lavagem a eluição. Numa primeira fase, para que a adsorção ocorra, ou seja, a ligação do DNA às partículas de sílica, deve-se utilizar uma solução tampão de elevada carga iónica e baixo pH. Além disso, estão presentes resinas iónicas na solução alcoólica na membrana, o que

permite a desnaturação de proteínas contaminantes. De seguida, procede-se à realização de várias lavagens com diferentes tipos de soluções-tampão com etanol, com o objetivo de remover proteínas, polissacarídeos e sais. Por último, o DNA é eluído num tampão de eluição, de baixa concentração salina e elevado pH.

Em conformidade com as instruções do fabricante, foi adicionado 30µL de proteinase K a 200µL de sangue periférico e incubou-se a mistura a 60°C durante 15 minutos. Seguidamente, acrescentou-se 200µL de *FABG buffer* e homogeneizou-se a mistura no vórtex. Após este processo, voltou-se a incubar a amostra a 70°C durante 15 minutos. Logo após, juntou-se 200µL de etanol à solução, e vortexou-se durante 10 segundos. Posteriormente, o conteúdo de cada amostra foi transferido para uma coluna e centrifugou-se durante 5 minutos. De seguida, procedeu-se às lavagens das amostras biológicas na coluna, para tal adicionou-se 400µL de *W1 buffer* e centrifugou-se durante 30 segundos e 600µL de *Wash buffer* e novamente durante 30 segundos. Na fase da eluição, foi necessário colocar a coluna num *ependorf* de 1.5ml e adicionar 100µL de *Elution buffer*, pré-aquecido a 70°C. De seguida, deixou-se incubar as amostras durante 3 a 5 minutos, à temperatura ambiente, até este ser absorvido pela membrana. Por último, centrifugou-se a amostra durante 30 segundos e armazenou-se o DNA genómico.

2.2. Genotipagem dos Polimorfismos *ERCC1 C8092A* e *XRCC3 Thr241Met*

Os polimorfismos foram selecionados segundo alguns critérios, tendo em conta evidências científicas de estudos prévios, bases de dados públicas que fornecem informações sobre os riscos fenotípicos, o efeito biológico do polimorfismo e o facto do alelo menos frequente ter uma frequência de pelo menos 10% a 20%.

Na amostra em estudo, a caracterização dos polimorfismos *ERCC1 C8092A* e *XRCC3 Thr241Met* foi realizada por discriminação alélica, através de tecnologia *TaqMan* (*Applied Biosystems*), utilizando a técnica de *Real Time Polymerase Chain Reaction* (*Real Time PCR*). A amplificação foi detetada e analisada recorrendo-se ao aparelho *Real Time 7300* ABL e ao software *Sequence Detection System ABI 7300*, versão 1.2.3 da *Applied Biosystems* (Figura 10 e 11).

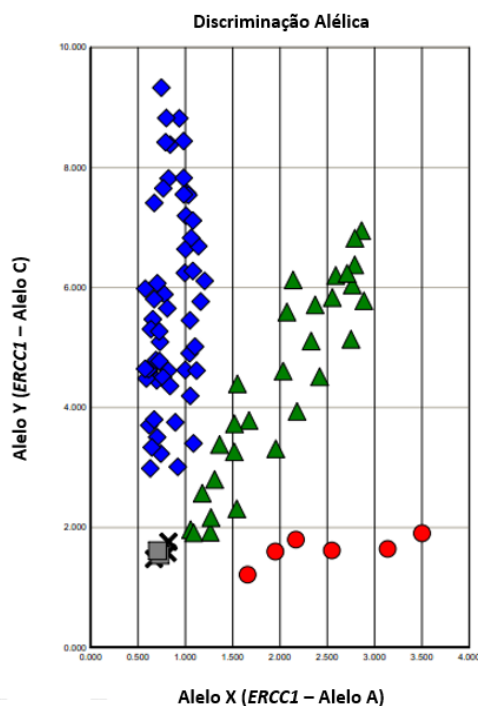


Figura 10 - Representação de um Real Time PCR relativo ao polimorfismo ERCC1 C8092A (Azul – genótipo CC; Verde – genótipo CA; Vermelho – genótipo AA; Cinzento – controlos negativos)

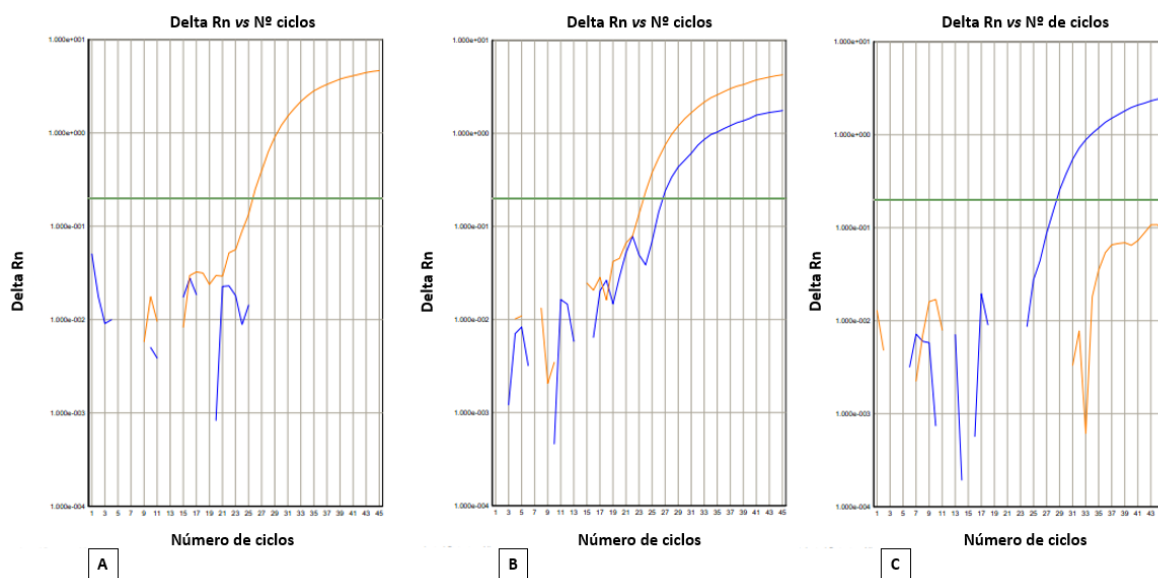


Figura 11 - Representação das curvas de fluorescência correspondentes a cada genótipo para o polimorfismo ERCC1 C8092A (A – genótipo CC; B – genótipo CA; C – genótipo AA)

Esta técnica revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA, pelo que permite detetar e quantificar os produtos de PCR em tempo real, à medida que o DNA alvo é amplificado e possibilita a monitorização da amplificação, aumentando a sua precisão e reprodutibilidade e reduzindo a probabilidade de contaminação. A discriminação alélica é realizada por emissão de fluorescência, tendo em consideração a utilização de uma sonda

oligonucleotídica de ligação ao DNA. De tal forma, é necessário a ligação de dois fluorómetros (VIC® e FAM™) à extremidade 5' de cada uma das sondas de discriminação alélica, assim como a ligação adicional de uma molécula *minor groove binder* (MGB) à extremidade 3', de forma a estabilizar as sondas na cadeia de DNA complementar.

Como já foi referido, é necessário uma sonda específica que se ligue ao meio da sequência alvo. Essa sonda é marcada com dois fluorocromos, um *Reporter* na extremidade 5' e um *Quencher* na extremidade 3', o qual absorve a fluorescência do fluorocromo *Reporter*, enquanto a sonda está intacta. Devido a extremidade 3' estar bloqueada, essa sonda não pode iniciar a síntese de novas cadeias de DNA. Durante reação de PCR, a *Taq* DNA polimerase sintetiza uma nova cadeia de DNA, mas durante a amplificação da sequência alvo, a sonda é clivada e hidrolisada pela atividade exonuclease 5'→3' da *Taq* DNA polimerase, levando à libertação da molécula *Reporter*. Assim, como resultado desta reação existe um aumento da emissão de fluorescência, que vai aumentar exponencialmente, durante cada ciclo de *Real Time* PCR. A discriminação alélica ocorre por emparelhamento seletivo de uma das sondas, no caso de homozigotia, ou de ambas, perante heterozigotia, utilizando, para tal, a sequência complementar entre os *primers forward* e *reverse*. Os *assays* utilizados estão descritos na tabela 4, bem como as respetivas sondas marcadas com fluorocromos específicas para cada alelo.

Tabela 4 - Informação complementar dos *assays* utilizados e das respetivas sondas específicas

ERCC1 – rs3212986	
Assay	C__2532948_10
VIC®	Alelo A
FAM™	Alelo C
CACAGGCCCGGACAAGAAGCGGAAG [A/C] GCAGCAGCAGCAGCCTGTGTAGTC	
XRCC3 – rs861539	
Assay	C__8901525_10
VIC®	Alelo A
FAM™	Alelo G
GAAGGCACTGCTCAGCTCACGCAGC [A/G] TGGCCCCAGGGACTGCAGATGCCT	

Para o estudo de ambos os polimorfismos, a reação de amplificação, que fez um volume de reação final de 6µL/caso, continha 2,5µL de 2x *Taqman Universal Master Mix*, 0,125µL de 40x *Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Assay*, 2,375µL de água bidestilada

estéril *Braun*®) e 1 µL de DNA (~20ng). As condições de amplificação basearam-se na ativação da *Taq* DNA polimerase a 95°C, durante 10 minutos, seguindo-se 45 ciclos de 92°C por 15 segundos para desnaturação e de 60°C durante 1 minuto para o emparelhamento dos *primers* e extensão final.

Como controlo de qualidade na execução do protocolo, dois controlos negativos foram incluídos em cada reação de genotipagem, para confirmar a ausência de contaminação, a genotipagem foi realizada sem conhecimento prévio das características clínicas das doentes e os resultados de discriminação alélica foram repetidos de forma aleatória em 10% das amostras e analisados por dois investigadores independentes.

2.3. Avaliação da resposta ao tratamento

A resposta à QRT foi avaliada segundo os critérios de *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors* (RECIST). A resposta completa (RC) indica o desaparecimento da doença, a resposta parcial (RP) designa que pelo menos 50% de redução da extensão tumoral, a doença estável (DE) significa que a lesão apresenta progressão menor ou igual 25% ou uma diminuição menor que 50%, e a doença progressiva (PD) indica um alargamento da lesão superior a 25%, ou o aparecimento de uma nova lesão. As doentes com RC e RP foram incluídas no grupo de boa resposta à terapia e as doentes com DE e PD classificadas como tendo fraca resposta.

2.4. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa estatístico IBM SPSS *Statistics*, versão 22.0.

O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi calculado através do teste *goodness of fit* de Pearson, por comparação das frequências genotípicas observadas *versus* esperadas. A análise pelo teste X^2 foi utilizada para a comparação das diferentes variáveis categóricas, com um nível de significância de 5%. O valor p obtido pelo teste X^2 foi considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0,05. A frequência genotípica foi ajustada para as possíveis variáveis de confundimento.

O valor de *Odds Ratio* (OR) e respetivo intervalo de confiança (IC) a 95% foi utilizado como estimativa da associação entre os diferentes genótipos dos polimorfismos e o risco para desenvolver toxicidade ao tratamento.

As curvas de probabilidade de sobrevivência (sobrevivência global e sobrevivência livre de doença) após tratamento foram obtidas recorrendo ao teste estatístico de *Kaplan-Meier* e a sua análise realizada pelo teste *Log Rank (Mantel-Cox)*. A duração da sobrevivência global foi definida como o intervalo de tempo entre o diagnóstico e a morte ou última avaliação clínica da doente e a duração da sobrevivência livre de doença foi definida como o período de tempo decorrido entre a data de diagnóstico e o momento de recorrência da doença. A causa de morte foi determinada a partir dos registos médicos das doentes.

IV. Resultados



1. Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos *ERCC1 C8092A* e *XRCC3 Thr241Met*

Relativamente ao polimorfismo *ERCC1 C8092A*, nas 257 doentes estudadas, as frequências genotípicas foram de 58.4%, 31.1% e 10.5% para o genótipo CC, CA e AA, respetivamente. Em relação às frequências alélicas para o alelo C obteve-se 74% e para o alelo A 26%. Quanto ao polimorfismo *XRCC3 Thr241Met*, nas 253 doentes analisadas, 35.2% são portadores do genótipo Thr/Thr (GG), 48.6% do genótipo Thr/Met (GA) e 16.2% do genótipo Met/Met (AA). No que respeita às frequências alélicas, para o alelo G foram de 59% e para o alelo A 41%. A análise do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* na população em estudo, de acordo com os genótipos, demonstrou que as frequências genotípicas observadas foram estatisticamente diferentes das esperadas para o polimorfismo no gene *ERCC1* ($p=0,002$) e similares para o polimorfismo no gene *XRCC3* ($p=0,891$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Frequências genotípicas dos polimorfismos *ERCC1 C8092A* e *XRCC3 Thr241Met* nas doentes com cancro do colo do útero

Polimorfismo	Frequências		HWE
	n	%	p
<i>ERCC1 C8092A</i>			
CC	150	58.4	0,002
CA	80	31.1	
AA	27	10.5	
Total	257	100	
<i>XRCC3 Thr241Met</i>			
Thr/Thr (GG)	89	35.2	0,891
Thr/Met (GA)	123	48.6	
Met/Met (AA)	41	16.2	
Total	253	100	

HWE – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

2. Avaliação da influência dos polimorfismos *ERCC1 C8092A* e *XRCC3 Thr241Met* na resposta terapêutica

Com o objetivo de avaliar o papel dos polimorfismos estudados na resposta ao tratamento de QRT, tal como referido anteriormente, agrupou-se por boa resposta, as doentes que apresentaram uma resposta completa (RC) ou parcial (RP) ao tratamento e por fraca resposta, as que mostraram uma doença persistente/estável (DE) ou doença progressiva (PD).

No que concerne à resposta ao tratamento, foram avaliadas 260 doentes, sendo que 197 apresentaram resposta completa, 45 resposta parcial, 12 doença estável e 6 doença progressiva. Assim, a taxa de boa resposta foi de 93.08% e a de fraca resposta de 6.92%. Relativamente às doentes com CCU, a taxa de boa resposta de acordo com os genótipos CC, AC e AA do polimorfismo *ERCC1 C8092A* foi de 58.2%, 30.9% e 10.9% e respetivamente e a taxa de fraca resposta foi de 61.1%, 33.3% e 5.6%, respetivamente. Para este polimorfismo, foram avaliadas 239 doentes e não se verificou nenhuma correlação significativa entre os diferentes genótipos e a resposta terapêutica ($p=0,776$). Quanto ao polimorfismo *XRCC3 Thr241Met*, a taxa de boa resposta de acordo com os genótipos Thr/Thr (GG), Thr/Met (GA) e Met/Met (AA) foi de 36.0%, 48.3% e 15.7%, respetivamente e a taxa de fraca resposta foi de 23.5%, 53.0% e 23.5%, respetivamente. Relativamente a este polimorfismo foram analisadas 236 doentes e também não se observou nenhuma associação entre as variantes genéticas e a resposta ao tratamento ($p=0,503$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Associação dos polimorfismos *ERCC1 C8092A* e *XRCC3 Thr241Met* com a resposta à quimiorradioterapia em doentes com cancro do colo do útero

Polimorfismo	Tipo de resposta ao tratamento				
	Boa resposta (RC+RP)		Frac resposta (DE+PD)		
	n	%	n	%	p
ERCC1 C8092A					
CC	139	58.2	11	61.1	0,776
CA	74	30.9	6	33.3	
AA	26	10.9	1	5.6	
Total	239	100	18	100	
XRCC3 Thr241Met					
Thr/Thr (GG)	85	36.0	4	23.5	0,503
Thr/Met (GA)	114	48.3	9	53.0	
Met/Met (AA)	37	15.7	4	23.5	
Total	236	100	17	100	

RC, resposta completa; RP, resposta parcial; DE, doença persistente/estável; PD, doença progressiva

3. Análise da associação entre os polimorfismos *ERCC1 C8092A* e *XRCC3 Thr241Met* e os endpoints clínicos:

3.1. Sobrevida Global

Na avaliação da influência dos polimorfismos em estudo na sobrevida global das doentes com cancro do colo do útero, foi possível observar que o tempo de sobrevida global não foi estatisticamente diferente de acordo com os genótipos do polimorfismo *ERCC1 C8092A* ($p=0,362$) (Figura 12A) e *XRCC3 Thr241Met* ($p=0,882$) (Figura 12B). Adicionalmente, foi realizado o modelo recessivo para o polimorfismo do gene *ERCC1* (AA vs CA e CC) e do gene *XRCC3* (Met/Met (AA) vs Thr/Met (GA) e Thr/Thr (GG)), no entanto também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos de ambos os polimorfismos e a sobrevida global, $p=0,196$ (Figura 13A) e $p=0,861$ (Figura 13B), respetivamente.

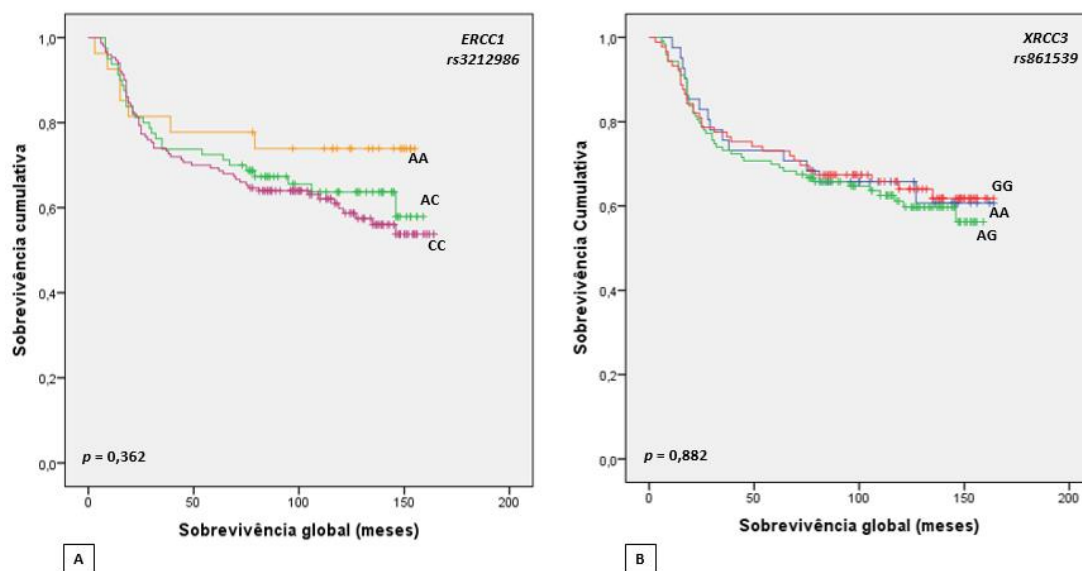


Figura 12 - Curvas de sobrevivência global obtidas pelo método de Kaplan-Meier e teste log rank em doentes com cancro do colo do útero, de acordo com os genótipos dos polimorfismos ERCC1 C8092A ($n_{AA}=27; n_{AC}=80; n_{CC}=150$) e XRCC3 Thr241Met ($n_{GG}=41; n_{AG}=123; n_{AA}=89$)

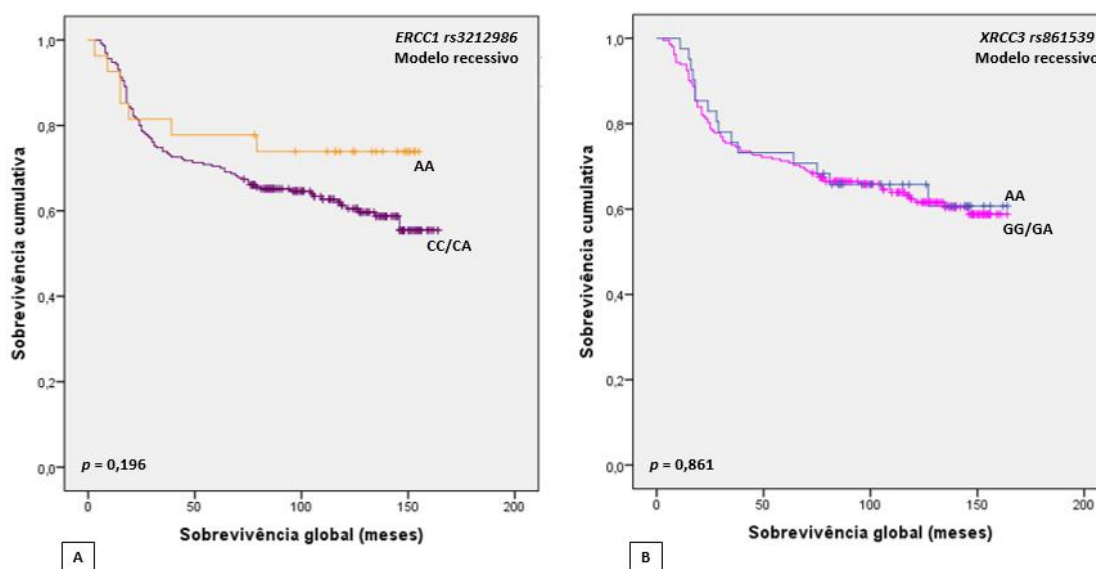


Figura 13 - Curvas de sobrevivência global obtidas pelo método de Kaplan-Meier e teste log rank em doentes com cancro do colo do útero, de acordo com o modelo recessivo para os polimorfismos ERCC1 C8092A (AA vs CC e CA) ($n_{AA}=27; n_{AC/CC}=230$) e XRCC3 Thr241Met (Met/Met (AA) vs Thr/Thr (GG) e Thr/Met (GA)) ($n_{AA}=41; n_{AG/GG}=212$)

3.2. Sobrevivência livre de doença

Através da análise dos resultados do polimorfismo *ERCC1* C8092A não se constatarem diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes genótipos e a sobrevivência livre de doença ($p=0,278$) (Figura 14A). Relativamente ao polimorfismo *XRCC3* Thr241Met também não se verificou nenhuma relação significativa entre os diferentes genótipos e o

tempo de sobrevivência livre de doença ($p=0,542$) (Figura 14B). Similarmente, aplicando o modelo recessivo para estes polimorfismos no gene *ERCC1* (AA vs CA e CC) e *XRCC3* (Met/Met (AA) vs Thr/Thr (GG) e Thr/Met (GA)) continuou-se a não se observar nenhuma associação com a sobrevivência livre de doença (*ERCC1* – $p=0,111$; *XRCC3* – $p=0,759$) (Figura 15A e 15B). Contudo, observou-se que as doentes portadoras do genótipo AA parecem manifestar um maior intervalo de tempo livre da doença, quando comparadas com as doentes portadoras dos genótipos CA e CC (Figura 14A).

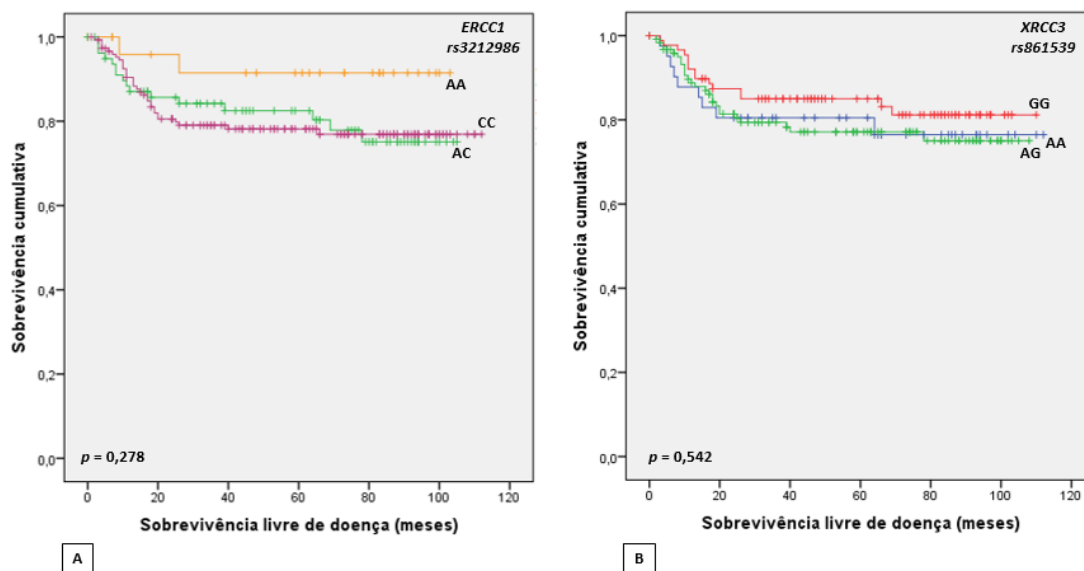


Figura 14 - Curvas de sobrevivência livre de doença obtidas pelo método de Kaplan-Meier e teste log rank em doentes com cancro do colo do útero, de acordo com os diferentes genótipos dos polimorfismos *ERCC1* C8092A ($n_{AA}=27$; $n_{AC}=80$; $n_{CC}=150$) e *XRCC3* Thr241Met ($n_{GG}=41$; $n_{AG}=123$; $n_{AA}=89$)

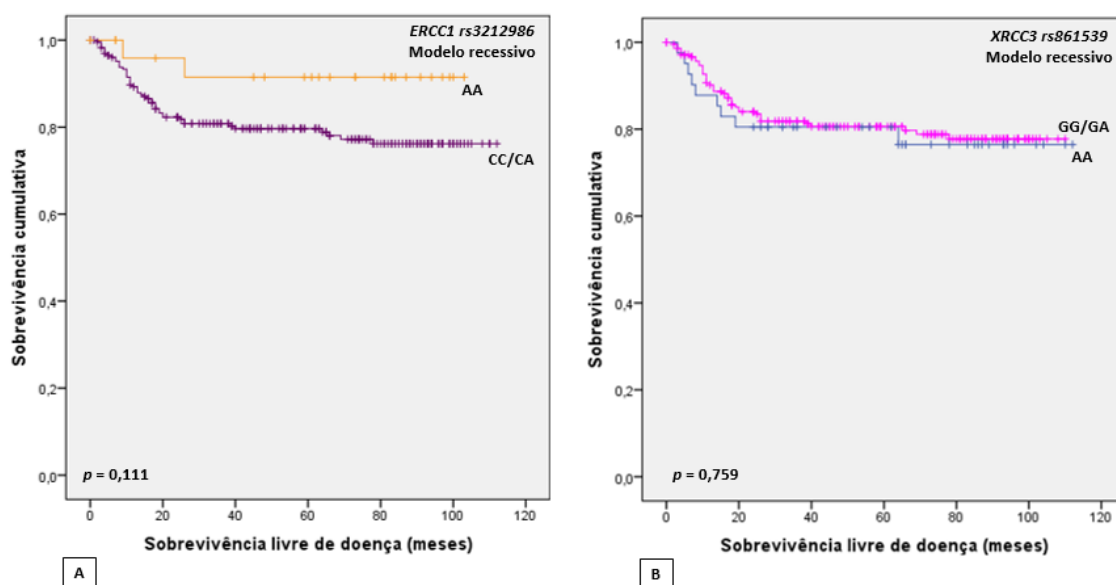


Figura 15 - Curvas de sobrevivência livre de doença obtidas pelo método de Kaplan-Meier e teste log rank em doentes com cancro do colo do útero, de acordo com o modelo recessivo para os polimorfismos *ERCC1* C8092A (AA vs CC e CA) ($n_{AA}=27$; $n_{AC/CC}=230$) e *XRCC3* Thr241Met (Met/Met (AA) vs Thr/Thr (GG) e Thr/Met (GA)) ($n_{AA}=41$; $n_{AG/GG}=212$)

Adicionalmente, tendo em conta o modelo recessivo, para o polimorfismo *ERCC1 C8092A* realizou-se uma análise estatística de acordo com algumas características clínico-patológicas, tais como estadió e hábitos tabágicos. Desta forma, para o estadió, verificou-se que as doentes com estadió inferior ou igual a IIa e com genótipo AA não manifestaram nenhuma associação estatisticamente significativa em relação à sobrevivência livre de doença ($p=0,391$) (Figura 16A). Contudo, os resultados demonstraram que para as doentes com estadió superior ou igual a IIb e portadoras do genótipo AA parece existir uma tendência para que estas doentes apresentem um maior intervalo livre de doença. Todavia, este resultado não foi estatisticamente significativo ($p=0,068$) (Figura 16B).

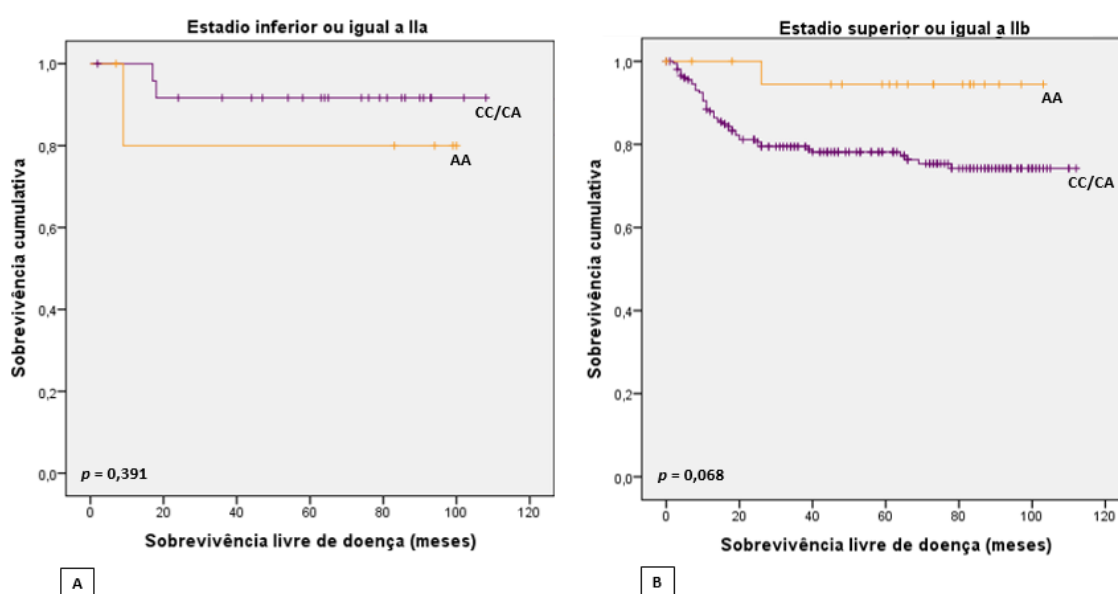


Figura 16 - Curvas de sobrevivência livre de doença obtidas pelo método de Kaplan-Meier e teste log rank em doentes com cancro do colo do útero, de acordo com o estadió (\leq IIa vs \geq IIb) e tendo em conta o modelo recessivo (AA vs CC e CA) para o polimorfismo *ERCC1 C8092A* (Para o estadió \leq IIa – $n_{AA}=6$; $n_{AC/CC}=25$; para estadió \geq IIb – $n_{AA}=21$; $n_{AC/CC}=205$)

Relativamente aos hábitos tabágicos, os resultados mostraram que as doentes fumadoras/ex-fumadoras e com genótipo AA não apresentam nenhuma associação estatisticamente significativa no que diz respeito à sobrevivência livre de doença, quando comparadas com as doentes portadoras dos genótipos CA e CC ($p=0,572$) (Figura 17A). No entanto, para as doentes não fumadoras e portadoras do genótipo AA observou-se um intervalo de tempo até atingir a recidiva superior às doentes portadoras dos genótipos CA e CC ($p=0,048$) (Figura 17B).

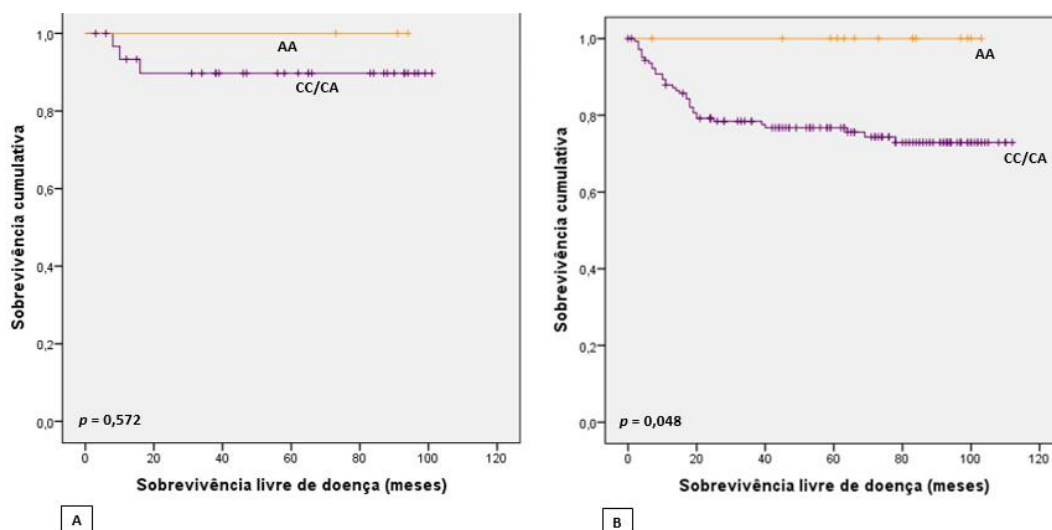


Figura 17 – Curva de sobrevivência livre de doença obtida pelo método de Kaplan-Meier e teste log rank em doentes com cancro do colo do útero, de acordo com os hábitos tabágicos (fumadoras/ex-fumadoras vs não fumadoras) e tendo em conta o modelo recessivo (AA vs CC e CA) para o polimorfismo *ERCC1 C8092A* (Para fumadoras e ex-fumadoras – $n_{AA}=3$; $n_{AC/CC}=34$; para estadios $\geq IIb$ – $n_{AA}=14$; $n_{AC/CC}=143$)

4. Determinação do efeito dos polimorfismos *ERCC1 C8092A* e *XRCC3 Thr241Met* na expressão de toxicidades provenientes da quimioradioterapia

De forma a avaliar a influência dos polimorfismos referidos nas diferentes toxicidades apresentadas pelas doentes com cancro do colo do útero em detrimento do tratamento à base de QRT, foi realizada uma análise univariável. As toxicidades avaliadas foram: anemia, neutropenia, neutropenia febril, trombocitopenia, pele (aguda e tardia), gastrointestinal (aguda e tardia), geniturinário (aguda e tardia).

Para as toxicidades como a anemia, neutropenia, neutropenia febril, trombocitopenia, pele (aguda e tardia), gastrointestinal (aguda) e geniturinário (aguda e tardia) não se constatou nenhuma diferença estatisticamente significativa, para ambos os polimorfismos estudados. No entanto, no que concerne à toxicidade gastrointestinal tardia, constatou-se uma associação estatisticamente significativa apenas para o polimorfismo *ERCC1 C8092A* ($p=0,038$). Das 141 doentes estudadas, 54 (38.3%) doentes manifestaram a presença de toxicidade gastrointestinal tardia, e dentro deste grupo, 27, 17 e 10 doentes eram portadoras do genótipo CC, CA e AA respetivamente. Os resultados obtidos encontram-se descritos nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Análise univariável entre os genótipos dos polimorfismos ERCC1 C8092A e XRCC3 Thr241Met e as diferentes toxicidades

Polimorfismo	Toxicidades																			
	Anemia						Neutropenia						Neutropenia febril				Trombocitopenia			
	Presente		Ausente		p	Presente		Ausente		Presente		Ausente		p	Presente		Ausente		p	
	n	%	n	%		n	%	n	%	n	%	n	%		n	%	n	%		
ERCC1 C8092A																				
CC	69	47.9	75	52.1		36	25.2	107	74.8		3	2.1	140	97.9		32	22.4	111	77.6	
CA	36	46.2	42	53.8	0.456	31	39.8	47	60.2	0.073	2	2.6	76	97.4	0.720	17	21.8	61	78.2	
AA	9	34.6	17	65.4		9	34.6	17	65.4		0	0	26	100		6	23.1	20	76.9	
XRCC3 Thr241Met																				
Thr/Thr (GG)	41	47.1	46	52.9		29	33.3	58	66.7		1	1.1	86	98.9		21	24.1	66	75.9	
Thr/Met (AG)	50	42	69	58.0	0.483	33	27.7	86	72.3	0.573	3	2.5	115	97.5	0.757	24	20.3	94	79.7	
Met/Met (AA)	20	52.6	18	47.4		13	35.1	24	66.7		1	2.6	37	97.4		9	23.7	29	76.3	

Tabela 7 - Análise univariável entre os genótipos dos polimorfismos ERCC1 C8092A e XRCC3 Thr241Met e as diferentes toxicidades (continuação)

Polimorfismo	Toxicidades											
	Pele (aguda)				Gastrointestinal (aguda)				Geniturinária (aguda)			
	Presente		Ausente		Presente		Ausente		Presente		Ausente	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
ERCC1 C8092A												
CC	5	3.5	138	96.5	18	12.7	124	87.3	49	34.3	94	65.7
CA	5	6.5	73	93.6	9	11.5	69	88.5	27	34.6	51	65.4
AA	2	7.7	24	92.3	3	11.5	23	88.5	11	42.3	15	57.7
XRCC3 Thr241Met												
Thr/Thr (GG)	5	5.7	82	94.3	14	16.1	73	83.9	34	39.0	53	61.0
Thr/Met (AG)	3	2.5	115	97.5	12	10.2	105	89.7	42	35.6	76	64.4
Met/Met (AA)	4	10.5	34	89.5	4	10.5	34	89.5	11	28.9	27	71.1

Tabela 8 - Análise univariável entre os genótipos dos polimorfismos *ERCC1 C8092A* e *XRCC3 Thr241Met* e as diferentes toxicidades tardias

Polimorfismo	Toxicidades											
	Pele (tardia)				Gastrointestinal (tardia)				Geniturinário (tardia)			
	Presente		Ausente		Presente		Ausente		Presente		Ausente	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>ERCC1 C8092A</i>												
CC	0	0	83	100	27	32.1	57	67.9	221	25.9	63	74.1
CA	0	0	41	100	17	40.5	25	59.5	10	24.4	31	75.6
AA	0	0	11	100	10	66.7	5	33.3	4	36.4	7	63.6
<i>XRCC3 Thr241Met</i>												
Thr/Thr (GG)	0	0	40	100	18	42.9	24	57.1	11	26.8	30	73.2
Thr/Met (AG)	0	0	71	100	28	37.8	46	62.2	19	26.8	52	73.2
Met/Met (AA)	0	0	23	100	7	29.2	17	70.8	6	25.0	18	75.0

Numa outra análise da toxicidade gastrointestinal (tardia), observou-se que no modelo recessivo para o polimorfismo *ERCC1 C8092A* (AA vs CA e CC) existem diferenças estatisticamente significativas, ou seja, doentes com o genótipo homozigótico AA apresentam um risco de aproximadamente quatro vezes superior de desenvolver este tipo de toxicidade comparativamente às doentes portadoras do alelo C (OR=3.727, IC 95% 1.199-11.588; $p=0,017$) (Tabela 9).

Tabela 9 - Análise univariável entre o modelo recessivo para o polimorfismo ERCC1 C8092A (AA vs CA e CC) e a toxicidade gastrointestinal (tardia)

Polimorfismo	Toxicidades						
Gastrointestinal (tardia)							
	Presente		Ausente		p	OR	Intervalo de confiança (95%)
	n	%	n	%			
ERCC1 C8092A							
AA	10	7.1	5	3.5	0,017	3.727	1.199 – 11.588
CA e CC	44	31.2	82	58.2			

OR – Odds ratio

V. Discussão



No decorrer dos últimos anos, os avanços alcançados pela investigação na área da Oncologia Molecular, contribuíram para uma melhor compreensão dos processos associados ao desenvolvimento e progressão do cancro. Esta doença é complexa e altamente heterogênea, pelo que se torna necessário estabelecer novas estratégias de prevenção, intervenção e tratamento (148).

A variabilidade individual na eficácia terapêutica é um grande desafio na prática clínica, pelo que são múltiplos e complexos os fatores que desencadeiam essas respostas heterogêneas ao tratamento. Deste modo, a Farmacogenómica é considerada uma das áreas de investigação mais promissora, pelo que permite o estudo do impacto da variação genética na resposta terapêutica (130, 149). Desde sensivelmente 1950, a variação genética nos humanos foi reconhecida como um fator importante e determinante na variabilidade individual da resposta aos fármacos, dado que pode afetar as curvas de dose-resposta da eficácia da terapia e a toxicidade nos doentes. As variações genéticas podem ser resultado de SNP's e da inserção, deleção ou duplicação das sequências de DNA. Alguns SNP's parecem modificar o efeito funcional do gene e, por este facto, têm vindo a ser alvo de estudo crescente (149). Quando estas alterações genéticas ocorrem em genes relacionados com os mecanismos de reparação do DNA, podem contribuir para a perda da integridade genómica, a iniciação e progressão do cancro, bem como podem conferir resistência aos tratamentos oncológicos (2, 42). A compreensão destes mecanismos celulares permitirá definir uma terapia personalizada com base no genoma de cada doente, de modo a aumentar a resposta terapêutica e, consequentemente, aumentar a qualidade de vida dos doentes e reduzir os elevados custos dos tratamentos, a longo prazo (104).

No presente estudo, foram analisados dois polimorfismos, o *ERCC1 C8092A* e *XRCC3 Thr241Met*, que estão envolvidos em duas vias de reparação, NER e HR, respetivamente. Ambos os polimorfismos têm sido estudados em diversas neoplasias malignas, porém os resultados relativamente à sua influência no desenvolvimento tumoral e na resposta à terapia são ainda controversos. Neste sentido, este estudo foi desenvolvido com o intuito de avaliar o efeito destes polimorfismos na evolução clínica de doentes caucasianas com diagnóstico de CCU tratadas com QRT concomitantes. Neste âmbito, foi avaliada a eficácia da resposta à QRT com cisplatina, a sobrevivência global e a sobrevivência livre de doença destas doentes, de acordo com as suas características clínico-patológicas. Adicionalmente, pretendeu-se avaliar o papel dos polimorfismos na expressão de toxicidades provenientes da quimioterapia e da radioterapia.

1. Análise das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos *ERCC1 C8092A* e *XRCC3 Thr241Met*

No presente estudo, as frequências alélicas do polimorfismo *ERCC1 C8092A* foram de 74% e 26% para os alelos C e A, respetivamente, sendo idênticas às frequências alélicas europeias. Contudo, quando realizado o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, as frequências genotípicas observadas não foram semelhantes às esperadas ($p=0,002$). Muitos estudos sugerem que os testes de *Hardy-Weinberg* têm sido utilizados para detetar erros na determinação do genótipo, mas estes testes têm baixa energia, a menos que o tamanho da amostra seja muito grande. Em contra partida, outros autores mencionam que as medidas de desequilíbrio deste teste podem ser úteis para detetar erros de genotipagem, porém, é necessário uma confirmação posterior com o conjunto de dados reais. Esta última abordagem tem recebido muita atenção, mas os dados e as simulações reais indicaram que os testes de *Hardy-Weinberg* têm um fraco poder para detetar erros de genotipagem em frequências de alelos comuns. Este desequilíbrio pode dever-se a várias características da população testada, nomeadamente ao tamanho da amostra, à seleção, mutação e migração. Assim, este desvio do equilíbrio pode ser devido ao acaso ou pela violação destes pressupostos (150-152). Relativamente ao polimorfismo *XRCC3 Thr241Met*, as frequências alélicas são semelhantes às da Europa, existindo assim uma frequência de aproximadamente 59% do alelo C e de 41% do alelo T. No que respeita à distribuição dos genótipos, não foi verificada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as frequências observadas e as esperadas ($p=0,891$).

2. Associação do polimorfismo *ERCC1 C8092A* com a resposta à quimiorradioterapia, sobrevivência global e sobrevivência livre de doença nas doentes com cancro do colo do útero

Um dos fármacos mais utilizados para o tratamento do CCU é a cisplatina, sendo utilizado concomitantemente com a RT, dado que é considerado um radiosensibilizador. Este fármaco pode conduzir a variações na resposta terapêutica, uma vez que alguns tumores são hipersensíveis e outros manifestam uma resistência intrínseca. Entre todas as vias de reparação do DNA, a via NER desempenha um papel essencial na reparação dos adutos de DNA produzidos pela cisplatina, na qual o gene *ERCC1* é essencial no processo de reparação. Vários estudos indicam que este gene é um dos mais promissores como fator preditivo da resposta ao tratamento oncológico e, por isso, deve ser analisado no contexto

da resistência a este fármaco (33, 102). Para além do mais, este gene desempenha um papel central na reparação das DSB's, o que possibilita especular que pode estar associado com a resposta à RT (74, 81).

Na literatura, a maioria dos estudos explora a expressão deste gene e os resultados obtidos na sua avaliação são inconsistentes, quando relacionados com a suscetibilidade para o cancro, a resposta terapêutica, a sobrevivência global e a sobrevivência livre de doença (77). Esta heterogeneidade de resultados pode estar correlacionada com os diferentes tipos histológicos tumorais, o número de doentes analisados e os tratamentos utilizados, conduzindo desta forma a diferentes respostas terapêuticas e comportamentos biológicos (53, 95). Porém, as diversas investigações clínicas sugerem que a expressão do *ERCC1* pode ser um útil marcador ou fator preditivo da resposta à QT à base de cisplatina em doentes com CCU (52, 101). Especificamente nesta neoplasia, num contexto geral, existem evidências de que baixos níveis de expressão de mRNA ou da proteína do gene *ERCC1* estão significativamente correlacionados com uma maior sobrevivência e uma melhor taxa de resposta completa, devido à sensibilidade das células tumorais à cisplatina, resultante da limitada reparação do DNA (31, 81, 95, 153). Consequentemente, esta alteração interfere com a resposta terapêutica e a sobrevivência global (52, 53, 66, 102, 132). Todavia, contrariamente, alguns estudos concluíram que baixos níveis de mRNA ou da proteína estão associados a uma menor sobrevivência (33, 94, 101). Um outro estudo concluiu que a expressão diferenciada da proteína ERCC1 por si só não é suficiente para discriminar as doentes que podem vir a ter um maior benefício quando submetidas a QRT (79).

Como mencionado anteriormente, os SNP's podem modificar o aminoácido expresso e, consequentemente, afetar a proteína sintetizada e influenciar a expressão génica. Assim, em particular, o polimorfismo *C8092A* do gene *ERCC1* parece afetar a estabilidade do mRNA, induzindo uma diminuição dos níveis de expressão da proteína (53, 77). Na análise da resposta terapêutica, sobrevivência global e sobrevivência livre de doença, os resultados obtidos em várias neoplasias, como o cancro do esófago, ovário, nasofaringe, gástrico e CPNPC são contraditórios (154-158).

Relativamente ao CCU, este é o primeiro estudo a avaliar o papel deste polimorfismo na resposta à terapia, sobrevivência global e sobrevivência livre de doença. Desta forma, após a análise estatística, os resultados mostraram que, num contexto geral, não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre os genótipos deste polimorfismo com a resposta terapêutica ($p=0,776$), sobrevivência global ($p=0,362$) e sobrevivência livre de doença ($p=0,278$). Contudo, ao avaliar as curvas da sobrevivência global, apesar dos

resultados não serem significativos, as doentes portadoras do genótipo AA parecem apresentar uma tendência para um aumento da sobrevivência em comparação com as doentes com genótipos CA e CC. Esta diferença poderá ser uma consequência funcional da diminuição da reparação dos danos induzidos pela cisplatina em detrimento da via NER, que proporciona uma melhor eficácia terapêutica. Quanto à avaliação da sobrevivência livre de doença, os resultados também revelaram uma tendência para as doentes portadoras do genótipo AA terem um maior intervalo de tempo livre da doença. Neste sentido, tendo em conta o modelo recessivo (AA vs CA e CC), as doentes foram estratificadas de acordo com o estadio, visto ser um dos fatores de prognóstico mais importante em CCU. A estratificação considerada foi estadios inferiores ou iguais a IIa versus estadios superiores ou iguais a IIb, uma vez que vários autores consideram esta divisão como a mais ideal entre os estadios precoces e os localmente avançados ou avançados (159). Assim, concluiu-se que, apesar dos resultados não serem estatisticamente significativos, existe uma tendência para as doentes com estadio superior ou igual a IIb e portadoras do genótipo AA apresentarem um maior intervalo de tempo livre da doença ($p=0,068$). É importante referir que este é um resultado preliminar, no entanto merece algum destaque devido à proximidade dos resultados obtidos com o valor de significância. Desta forma, torna-se necessário realizar estudos adicionais de modo a interpretar os nossos resultados, dado que não existem evidências que suportem os resultados obtidos.

Contudo, com base nos resultados demonstrados em outros estudos, nomeadamente em cancro da nasofaringe, este polimorfismo foi considerado um fator preditivo independente da resposta à QT à base de cisplatina e os doentes portadores do genótipo AA e CA apresentaram um risco de progressão da doença superior aos portadores do genótipo CC (155, 160). De igual forma, estes resultados são apoiados por estudos prévios no cancro do ovário (157, 161, 162). Contrariamente, no cancro do esófago avançado, as avaliações clínicas demonstraram que os doentes com genótipos AA e CA manifestaram uma melhor taxa de resposta, uma melhor sobrevivência global e sobrevivência livre de doença. Uma possível justificação para este resultado prende-se ao facto de estes genótipos estarem associados a uma maior sensibilidade aos fármacos à base dos platinos (158, 163). No CPNPC, a análise deste polimorfismo mostra resultados incoerentes, uma vez que é possível verificar que os doentes portadores do genótipo CC apresentam um melhor prognóstico, assim como os doentes com pelo menos uma variante polimórfica (CA ou AA) manifestam uma maior sobrevivência global. Mais uma vez, esta discrepância pode estar relacionada com os diferentes esquemas de QT e as diferentes características dos doentes, tais como o tipo histológico e estadio (156, 164).

Encontra-se bem documentado que o tabagismo é um fator de risco importante para o desenvolvimento do CCU e os dados epidemiológicos têm vindo a demonstrar que a proporção de mulheres com CCU invasivo, fumadoras ou ex-fumadoras, está a aumentar (26, 165-167). Na literatura, existem evidências que sugerem que o tabaco é capaz de induzir um efeito carcinogénico em vários locais que não estão diretamente expostos ao fumo do tabaco, como é o caso do colo do útero, onde é possível detetar derivados de nicotina, tais como nitrosaminas. Existem, ainda, indícios de que o tabaco está relacionado com a supressão dos mecanismos locais da resposta imunitária, pela redução do número de células de *Langerhans*. Por sua vez, pode ocorrer um efeito negativo sobre a capacidade do hospedeiro para desenvolver uma resposta imunitária eficaz contra as infeções virais, aumentando o risco de infeções persistentes no colo do útero. Nesse âmbito, a principal via de reparação destes danos relacionados com o tabagismo, tais como os adutos de diol epóxido do benzo[*a*]pireno, é a via NER (168-170). Desta forma, um dos objetivos deste estudo foi avaliar a relação entre a sobrevivência livre de doença e o polimorfismo *ERCC1 C8092A* nas mulheres fumadoras e não fumadoras. Os resultados mostraram uma diferença estatisticamente significativa entre a sobrevivência livre de doença e este polimorfismo, tendo em conta os hábitos tabágicos das doentes, ou seja, em doentes não fumadoras com genótipo AA verificou-se um intervalo de tempo até atingir a recidiva superior às doentes portadoras dos genótipos CC e AC ($p=0,048$). O mecanismo exato da interação entre o polimorfismo *ERCC1 C8092A* e os hábitos tabágicos necessita de uma investigação mais aprofundada. Contudo, Zhou e os seus colaboradores avaliaram esta mesma associação em doentes com cancro do pulmão e demonstraram que o genótipo AA deste polimorfismo está associado a uma menor capacidade de reparação do DNA, tendo sido considerado um fator de risco para a carcinogénese do cancro do pulmão em não fumadores e um fator protetor em fumadores (168). Para além do mais, os fumadores ativos estão expostos a vários agentes carcinogénicos do tabaco, que podem induzir graves danos no DNA e gerar células pré-neoplásicas. Também, é possível que uma eficaz reparação do DNA possa diminuir a taxa de apoptose de algumas células pré-neoplásicas. Assim, um maior nível da apoptose pode ser uma das razões para se observar um aumento da sobrevivência livre de doença nas doentes com CCU portadoras do genótipo AA e não fumadoras (168, 171). Outra possível explicação depreende-se com o facto das fumadoras com CCU invasivo poderem estar relacionadas com uma resposta terapêutica inferior, após a QRT. Tal poderá ser justificado, provavelmente pelo ato de fumar ser conhecido por aumentar a hipóxia tumoral devido aos elevados níveis de carboxihemoglobina (HbCO) que, por sua vez, podem reduzir a resposta à radiação e aumentar o potencial metastático (167, 172).

3. Relação do polimorfismo *XRCC3 Thr241Met* com a resposta à quimiorradioterapia, a sobrevivência global e a sobrevivência livre de doença nas doentes com cancro do colo do útero

Vários estudos têm mostrado que a integração e a replicação do HPV pode induzir rearranjos dentro da região de integração, sendo necessário a ativação dos *checkpoints* do ciclo celular e o recrutamento de proteínas da via HR para a reparação dos danos no DNA. Desta forma, é possível especular que os polimorfismos em genes envolvidos na via HR podem estar diretamente relacionados com o CCU, nomeadamente com o desenvolvimento e a progressão tumoral (23, 120). As vias de reparação das DSB's constituem uma defesa preliminar contra os danos no DNA, gerados pela radiação ionizante e pelos agentes alquilantes, como a cisplatina (26, 120). A reparação dos danos no DNA é um processo complexo e multifásico, no qual o gene *XRCC3* desempenha um papel direto na HR, sendo importante para manter a estabilidade dos cromossomas e a reparação das DSB's induzidas pela QRT (173). Além disso, o gene *XRCC3* parece estar associado à radiosensibilidade clínica e quando sofre alterações na sua expressão pode ser mais sensível à cisplatina (51, 126, 174).

No que refere ao CCU, a maioria dos estudos analisou a associação entre este polimorfismo e a suscetibilidade para o desenvolvimento desta neoplasia e, na generalidade, esta relação não está clarificada devido à inconsistência dos dados e à limitada existência destas investigações (23, 26, 120, 122, 146, 147, 175).

Além disso, diversos estudos têm também vindo a avaliar o efeito do polimorfismo *XRCC3 Thr241Met* na resposta terapêutica, uma vez que as variantes alélicas deste polimorfismo parecem alterar a expressão do gene e, por conseguinte, afetar a capacidade de reparação das células e a sensibilidade ao tratamento (143, 144, 176). Neste sentido, este polimorfismo foi estudado em diversas neoplasias, nomeadamente no CPNPC, cancro da mama, esófago avançado, adenocarcinoma do estômago, mas ainda não foi explorado no CCU (177-181). Porém, até ao momento, os estudos apresentam resultados controversos, sendo necessário realizar mais análises para esclarecer o putativo papel deste polimorfismo na evolução clínica de doentes com cancro. Assim, a associação entre o polimorfismo *Thr241Met* do gene *XRCC3* é inconsistente no que refere à análise do risco, resposta terapêutica, sobrevivência global e sobrevivência livre de doença (120). A heterogeneidade das características das doentes incluídas nestes estudos, como a etnicidade, os hábitos, a localização geográfica, o tipo de dieta e a idade pode influenciar os resultados (120).

De modo a contribuir para o esclarecimento do papel do polimorfismo *XRCC3 Thr241Met* na eficácia da resposta ao tratamento e no prognóstico de doentes com CCU, o presente estudo parece ser o primeiro a avaliar essa possível associação. Os resultados obtidos não indicaram nenhuma associação estatisticamente significativa quer na resposta terapêutica ($p=0,503$), quer na sobrevivência global ($p=0,882$) e na sobrevivência livre de doença ($p=0,542$). Desta forma, é possível afirmar que este polimorfismo parece não ser um fator preponderante para prever a evolução clínica/prognóstico de doentes com CCU. Contudo, estudos em outras neoplasias apontam para que indivíduos portadores do genótipo Met/Met estejam associados a níveis mais elevados de adutos no DNA e, consequentemente, a um aumento da quimiossensibilidade. Estes factos reforçaram a importância de estudar a possível relação entre este polimorfismo e a eficácia da QT (173, 177, 178, 182). Neste sentido, um estudo em cancro do pulmão verificou que a sobrevivência global foi superior e estatisticamente significativa nos doentes com genótipo Thr/Thr comparativamente aos genótipos Thr/Met e Met/Met, após serem tratados sem recorrer a fármacos como a gemcitabina/cisplatina ou carboplatina. No entanto, quando os doentes foram tratados com gemcitabina/cisplatina ou carboplatina, os autores constaram que os indivíduos portadores do genótipo Met/Met ou Thr/Met apresentavam uma maior sobrevivência global. A razão para estes resultados opostos não é clara, porém, uma possível explicação pode estar relacionada com o polimorfismo, pelo que este pode induzir alterações farmacogenómicas relevantes na gemcitabina (173, 182). Além disso, um outro estudo em pulmão associou os doentes com genótipo Thr/Thr a uma melhor taxa de resposta, sobrevivência global e sobrevivência livre de doença (53). Também foi verificado que em adenocarcinomas do esófago localmente avançado, a variante heterozigótica apresentava uma melhor sobrevivência global (179).

4. Efeito dos polimorfismos *ERCC1 C8092A* e *XRCC3 Thr241Met* na expressão de toxicidades provenientes da quimiorradioterapia

Um dos principais obstáculos inerentes a uma resposta eficaz aos tratamentos oncológicos encontra-se relacionado com a manifestação de toxicidades associadas às abordagens terapêuticas, como a quimioterapia e a radioterapia. Relativamente ao CCU são utilizados diferentes esquemas de QRT, mas a maioria dos esquemas inclui derivados de platinos. Portanto, a QRT à base de platinos é considerada uma das abordagens terapêuticas de primeira linha para doentes com CCU localmente avançado e está associada a toxicidades agudas e tardias. Aproximadamente 30% das doentes apresentam toxicidades

hematológicas agudas com um grau superior ou igual a 3 e cerca de 1.5% mostram toxicidade geniturinária aguda com um grau superior ou igual a 3. Quanto à toxicidade gastrointestinal, este tipo de efeito adverso é duas vezes superior nas mulheres tratadas com QRT em relação às tratadas com apenas RT (183, 184). A maioria das mulheres com CCU manifesta ainda sintomas relacionados com as lesões provocadas pela radiação no sistema gastrointestinal, aquando a irradiação pélvica. É importante referir, que com a evolução das técnicas de RT, como a RT de intensidade modelada (IMRT) e a BT de baixa taxa guiada por ressonância magnética, espera-se uma diminuição da gravidade das toxicidades gastrointestinais e geniturinárias agudas ou tardias (184, 185).

Ao que parece a incidência e a severidade destes sintomas estão associadas a uma interação complexa entre os fatores genéticos e o tratamento aplicado, pelo que existe uma correlação óbvia entre o volume do intestino irradiado e a toxicidade aguda (184, 186). Desta forma, será pertinente estudar uma possível relação entre polimorfismos associados à reparação do DNA e a expressão de toxicidades originadas pelos agentes platinos e pela radiação ionizante. Neste sentido, este é o primeiro estudo a avaliar a relação entre os polimorfismos *ERCC1 C8092A* e *XRCC3 Thr241Met* e as toxicidades em CCU. Contudo, devido à variabilidade associada às definições relacionadas com as toxicidades, será difícil estabelecer comparações com outros estudos. Para tal, foram consideradas diversas toxicidades como a anemia, neutropenia, neutropenia febril, trombocitopenia, toxicidade na pele aguda e tardia, toxicidade gastrointestinal aguda e tardia e toxicidade geniturinária aguda e tardia. Assim, ao interpretar os resultados obtidos para o polimorfismo *XRCC3 Thr241Met*, não se constatou diferenças estatisticamente significativas entre este polimorfismo e as diversas toxicidades, nomeadamente para a anemia ($p=0,483$), neutropenia ($p=0,573$), neutropenia febril ($p=0,757$), trombocitopenia ($p=0,789$), toxicidade na pele aguda ($p=0,129$) e tardia (sem valor p), toxicidade gastrointestinal aguda ($p=0,425$) e tardia ($p=0,544$) e toxicidade geniturinária aguda ($p=0,553$) e tardia ($p=0,984$). Na literatura, a relação entre a radiosensibilidade das células tumorais e este polimorfismo, dependendo das linhas celulares de CCU utilizadas, demonstra resultados opostos (51). Para além do mais, um estudo de Ruyck e seus colaboradores analisou a relação entre o risco de desenvolver reações adversas à RT em doentes que efetuaram tratamento a tumores ginecológicos e no caso do polimorfismo *XRCC3 Thr241Met*, não verificaram nenhuma associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo e o elevado risco de apresentar reações nos tecidos normais (174).

Simultaneamente, neste estudo, ao analisar o polimorfismo *ERCC1 C8092A* verificou-se apenas diferenças estatisticamente significativas na associação entre os genótipos deste polimorfismo e a toxicidade gastrointestinal tardia ($p=0,038$). Adicionalmente, tendo em

conta o modelo recessivo (AA vs CA e CC), também se observou que este polimorfismo influencia a expressão da toxicidade gastrointestinal tardia. Desta forma, os resultados obtidos demonstraram que as doentes com o genótipo homozigótico AA apresentam um risco de aproximadamente quatro vezes superior de desenvolver este tipo de toxicidade comparativamente às doentes portadoras do alelo C (OR=3,727, IC 95% 1,199-11,588; $p=0,017$). O efeito deste polimorfismo na manifestação de toxicidades associadas às terapias não tem sido muito explorado. Porém, Suk *et al.* analisou a sua influência no cancro do pulmão e constatou que a incidência de toxicidade gastrointestinal de grau 3 e 4 foi significativamente superior em doentes portadores de pelo menos um alelo variante (AA e CA), que podem estar associados a um aumento do risco de desenvolver esta toxicidade. Pelo facto deste polimorfismo possivelmente levar à destabilização do mRNA do gene *ERCC1* e à diminuição dos níveis de expressão da respetiva proteína, poderá induzir a uma diminuição da reparação dos danos e, consequentemente, a um aumento da toxicidade. Por sua vez, este polimorfismo interfere na via NER, que pode ser crucial para a reparação dos danos nos tecidos normais durante o tratamento citotóxico e para a prevenção da toxicidade relacionada com o tratamento. Desta forma, este aumento da toxicidade associada ao genótipo AA pode estar correlacionado com a diminuição da estabilidade do mRNA e com a diminuição da atividade da via NER, induzindo assim uma maior toxicidade e um aumento da suscetibilidade do tecido a danos provocados pelos platinos. Até ao momento desconhece-se o mecanismo exato pela qual o polimorfismo afeta a estabilidade do mRNA (187).

Tendo em conta as possíveis limitações existentes neste tipo de estudo, é possível afirmar que o viés de seleção das doentes foi minimizado, pelo facto de terem sido selecionadas de forma consecutiva num determinado período de tempo e as suas características clínico-patológicas serem representativas das da população em geral. Contudo, uma possível limitação deste estudo pode estar relacionada com os resultados das toxicidades, dado que os critérios para avaliar os diferentes graus deste tipo de efeito colateral são subjetivos.

VI. Conclusão e Perspetivas futuras



A medicina personalizada pode contribuir para a identificação precoce de um subgrupo de doentes que possa beneficiar de uma determinada terapia reajustada face à sua informação genética, de modo a aumentar a eficácia do tratamento e diminuir as toxicidades. Neste sentido, a análise de variações genéticas interindividuais, como o estudo de polimorfismos genéticos torna-se relevante para a caracterização da suscetibilidade e para a seleção mais adequada das abordagens terapêuticas. Assim, com base nestas alterações genéticas, a definição de perfis de suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro e preditivos do prognóstico poderá ser uma ferramenta útil na implementação de estratégias de prevenção e na escolha do tratamento para cada doente, de forma a diminuir a incidência e a mortalidade por cancro.

Recentemente, o papel dos polimorfismos em genes associados à reparação do DNA no desenvolvimento e progressão do cancro e na resposta terapêutica tem recebido especial atenção. Em termos gerais, neste estudo, foram avaliados dois polimorfismos relacionados com este mecanismo de resposta celular aos danos, nomeadamente os polimorfismos *ERCC1 C8092A* e *XRCC3 Thr241Met*, na evolução clínica de doentes com CCU. Os resultados obtidos apontam para que ambos os polimorfismos analisados não tenham influência na resposta terapêutica, na sobrevivência global e na sobrevivência livre de doença destas doentes. Contudo, na análise do papel do polimorfismo *ERCC1 C8092A* na sobrevivência livre da doença, tendo em conta a história de tabagismo das doentes, os resultados demonstraram que o genótipo AA parece influenciar a sobrevivência livre de doença em doentes não fumadoras com CCU, porém, o mecanismo exato da interação entre este polimorfismo e os hábitos tabágicos necessita de uma investigação mais aprofundada. Adicionalmente, também foi avaliada a associação entre ambos os polimorfismos e a expressão das toxicidades provenientes da QRT. Assim, nesta análise, verificou-se uma relação entre o polimorfismo *ERCC1 C8092A* e a toxicidade gastrointestinal tardia, ou seja, mais especificamente, doentes com o genótipo homozigótico AA apresentaram um risco de aproximadamente quatro vezes superior de desenvolver este tipo de toxicidade comparativamente às doentes portadoras do alelo C.

É de realçar, que o presente estudo é pioneiro na avaliação do papel destes polimorfismos na evolução clínica e prognóstico das doentes com CCU, bem como na expressão dos diferentes tipos de toxicidades inerentes à QRT. Tendo em consideração que os resultados obtidos ainda são preliminares, possivelmente estes podem carecer de alguma justificação funcional, pelo que estudos adicionais em CCU serão necessários.

Futuramente, seria relevante realizar ensaios funcionais, através da quantificação do mRNA dos genes *ERCC1* e *XRCC3* ou da avaliação da expressão proteica por

imunohistoquímica, de modo a comprovar o efeito funcional dos polimorfismos estudados. Para além do mais, seria interessante elaborar estudos prospetivos de modo a confirmar os resultados obtidos neste estudo. Outro estudo pertinente seria realizar uma análise combinada dos polimorfismos estudados ou incluindo outros polimorfismos em genes de reparação e os *endpoints* clínicos avaliados, de modo a definir um perfil farmacogenómico. Por fim, poder-se-ia ainda efetuar um estudo caso-controlo para averiguar se estes polimorfismos alteram o risco para desenvolver CCU.

VII. Bibliografia



1. Mould R. Brachytherapy 2. Netherlands 1989.
2. Han SS, Kim JW, Lee SH, Kim DH, Park NH, Song YS, et al. ERCC1 C19007T polymorphism and the risk and invasiveness of cervical cancer in Korean women. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2012;8(4):e63-7.
3. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(12):924-35.
4. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-403.
5. Weston A, Harris CC. *Multistage Carcinogenesis*. 6th ed: BC Decker; 2003 2003.
6. Horne SD, Pollick SA, Heng HH. Evolutionary mechanism unifies the hallmarks of cancer. *Int J Cancer*. 2015;136(9):2012-21.
7. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108.
8. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
9. Perez C, Halperin E, Brady L. *Principles and Practice of Radiation Oncology 5ª EDIÇÃO*: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
10. Janicek MF, Averette HE. Cervical cancer: prevention, diagnosis, and therapeutics. *CA Cancer J Clin*. 2001;51(2):92-114; quiz 5-8.
11. Wallace NA, Galloway DA. Novel Functions of the Human Papillomavirus E6 Oncoproteins. *Annu Rev Virol*. 2015;2(1):403-23.
12. Yim EK, Park JS. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat*. 2005;37(6):319-24.
13. Zhang L, Ruan Z, Hong Q, Gong X, Hu Z, Huang Y, et al. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and risk of cervical cancer: A case-control study. *Oncol Lett*. 2012;3(2):351-62.
14. Grigiene R, Valuckas KP, Aleknavicius E, Kurtinaitis J, Letautiene SR. The value of prognostic factors for uterine cervical cancer patients treated with irradiation alone. *BMC Cancer*. 2007;7:234.
15. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*. 2010;202(12):1789-99.
16. Medeiros R, Prazeres H, Pinto D, Macedo-Pinto I, Lacerda M, Lopes C, et al. Characterization of HPV genotype profile in squamous cervical lesions in Portugal, a

southern European population at high risk of cervical cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2005;14(5):467-71.

17. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.

18. Medeiros R, Ramada D. Knowledge differences between male and female university students about human papillomavirus (HPV) and cervical cancer: Implications for health strategies and vaccination. 2010;29(2):153–60.

19. Silva J, Ribeiro J, Sousa H, Cerqueira F, Teixeira AL, Baldaque I, et al. Oncogenic HPV Types Infection in Adolescents and University Women from North Portugal: From Self-Sampling to Cancer Prevention. *J Oncol.* 2011;2011:953469.

20. McNamara M, Batur P, Walsh JM, Johnson KM. HPV Update: Vaccination, Screening, and Associated Disease. *J Gen Intern Med.* 2016.

21. Saúde D-Gd. Diagnóstico e Estadiamento do Cancro Invasivo do Colo do Útero. In: Saúde DdQn, editor. Lisboa2012.

22. Medeiros R, Ramada D. Knowledge differences between male and female university students about human papillomavirus (HPV) and cervical cancer: Implications for health strategies and vaccination. *Vaccine.* 2010;29(2):153-60.

23. Perez LO, Crivaro A, Barbisan G, Poleri L, Golijow CD. XRCC2 R188H (rs3218536), XRCC3 T241M (rs861539) and R243H (rs77381814) single nucleotide polymorphisms in cervical cancer risk. *Pathol Oncol Res.* 2013;19(3):553-8.

24. Roura E, Travier N, Waterboer T, de Sanjose S, Bosch FX, Pawlita M, et al. The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort. *PLoS One.* 2016;11(1):e0147029.

25. Cassidy J, Bissett D, Obe RAJS. *Oxford Handbook of Oncology.* United States of America2002.

26. Settheetham-Ishida W, Yuenyao P, Natphopsuk S, Settheetham D, Ishida T. Genetic risk of DNA repair gene polymorphisms (XRCC1 and XRCC3) for high risk human papillomavirus negative cervical cancer in Northeast Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(4):963-6.

27. Beyzadeoglu M, Ozyigit G, Ebruli C. *Basic Radiation Oncology.* Turquia: Springer; 2010.

28. Rose PG. Chemoradiotherapy for cervical cancer. *Eur J Cancer.* 2002;38(2):270-8.

29. Nakano T, Ohno T, Ishikawa H, Suzuki Y, Takahashi T. Current advancement in radiation therapy for uterine cervical cancer. *J Radiat Res.* 2010;51(1):1-8.

30. Tangjitgamol S, Katanyoo K, Laopaiboon M, Lumbiganon P, Manusirivithaya S, Supawattanabodee B. Adjuvant chemotherapy after concurrent chemoradiation for locally advanced cervical cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;12:Cd010401.

31. Park JS, Jeon EK, Chun SH, Won HS, Lee A, Hur SY, et al. ERCC1 (excision repair cross-complementation group 1) expression as a predictor for response of neoadjuvant chemotherapy for FIGO stage 2B uterine cervix cancer. *Gynecol Oncol.* 2011;120(2):275-9.
32. Green J, Kirwan J, Tierney J, Vale C, Symonds P, Fresco L, et al. Concomitant chemotherapy and radiation therapy for cancer of the uterine cervix. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005(3):Cd002225.
33. Britten RA, Liu D, Tessier A, Hutchison MJ, Murray D. ERCC1 expression as a molecular marker of cisplatin resistance in human cervical tumor cells. *Int J Cancer.* 2000;89(5):453-7.
34. Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J Clin Oncol.* 2008;26(35):5802-12.
35. Kogel AJ, Michael. *Basic Clinical Radiobiology.* 4th, editor: A Hodder Arnold Publication; 4th edition; 2009. 375 p.
36. Jakubowicz J, Blecharz P, Skotnicki P, Reinfuss M, Walasek T, Luczynska E. Toxicity of concurrent chemoradiotherapy for locally advanced cervical cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2014;35(4):393-9.
37. Khalil J, El Kacemi H, Afif M, Kebdani T, Benjaafar N. Five years' experience treating locally advanced cervical cancer with concurrent chemoradiotherapy: results from a single institution. *Arch Gynecol Obstet.* 2015;292(5):1091-9.
38. Kong TW, Chang SJ, Paek J, Yoo SC, Yoon JH, Chang KH, et al. Comparison of concurrent chemoradiation therapy with weekly cisplatin versus monthly fluorouracil plus cisplatin in FIGO stage IIB-IVA cervical cancer. *J Gynecol Oncol.* 2012;23(4):235-41.
39. Zamaniah WI, Mastura MY, Phua CE, Adlinda A, Marniza S, Rozita AM. Definitive concurrent chemoradiotherapy in cervical cancer--a University of Malaya Medical Centre experience. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(20):8987-92.
40. Rosa DD, Medeiros LR, Edelweiss MI, Pohlmann PR, Stein AT. Adjuvant platinum-based chemotherapy for early stage cervical cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;6:Cd005342.
41. Petera J, Sirak I, Beranek M, Vosmik M, Drastikova M, Paulikova S, et al. Molecular predictive factors of outcome of radiotherapy in cervical cancer. *Neoplasma.* 2011;58(6):469-75.
42. Dexheimer TS. DNA Repair Pathways and Mechanisms. In: Mathews L, Cabarcas S, Hurt E, editors. *DNA Repair of Cancer Stem Cells: Springer Netherlands*; 2013. p. 19-32.

43. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):22-33.
44. Gil FdR. Influência de polimorfismos em genes de reparação do DNA na frequência de anomalias cromossômicas radioinduzidas. Universidade de Lisboa. Faculdade de ciências Departamento de biologia vegetal ed2008.
45. De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*. 2004;19(3):169-85.
46. Chen Y, Williams V, Filippova M, Filippov V, Duerksen-Hughes P. Viral carcinogenesis: factors inducing DNA damage and virus integration. *Cancers (Basel)*. 2014;6(4):2155-86.
47. Sharma KK, Swarts SG, Bernhard WA. Mechanisms of direct radiation damage to DNA: the effect of base sequence on base end products. *J Phys Chem B*. 2011;115(16):4843-55.
48. Mjelle R, Hegre SA, Aas PA, Slupphaug G, Drablos F, Saetrom P, et al. Cell cycle regulation of human DNA repair and chromatin remodeling genes. *DNA Repair (Amst)*. 2015;30:53-67.
49. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11(12):1513-30.
50. Bergstralh DT, Sekelsky J. Interstrand crosslink repair: can XPF-ERCC1 be let off the hook? *Trends Genet*. 2008;24(2):70-6.
51. Gurska S, Farkasova T, Gabelova A. Radiosensitivity of cervical cancer cell lines: the impact of polymorphisms in DNA repair genes. *Neoplasma*. 2007;54(3):195-201.
52. Arora S, Kothandapani A, Tillison K, Kalman-Maltese V, Patrick SM. Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. *DNA Repair (Amst)*. 2010;9(7):745-53.
53. Roco A, Cayun J, Contreras S, Stojanova J, Quinones L. Can pharmacogenetics explain efficacy and safety of cisplatin pharmacotherapy? *Front Genet*. 2014;5:391.
54. Zhang J, Walter JC. Mechanism and regulation of incisions during DNA interstrand cross-link repair. *DNA Repair (Amst)*. 2014;19:135-42.
55. McNeil EM, Astell KR, Ritchie AM, Shave S, Houston DR, Bakrania P, et al. Inhibition of the ERCC1-XPF structure-specific endonuclease to overcome cancer chemoresistance. *DNA Repair (Amst)*. 2015;31:19-28.
56. Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1291-5.
57. Bowden NA. Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? *Cancer Lett*. 2014;346(2):163-71.

58. Jordheim LP, Cros-Perrial E, Matera EL, Bouledrak K, Dumontet C. Expression of domains for protein-protein interaction of nucleotide excision repair proteins modifies cancer cell sensitivity to platinum derivatives and genomic stability. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014;41(10):817-24.
59. Iyama T, Wilson DM, 3rd. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*. 2013;12(8):620-36.
60. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:39-85.
61. Adair GM, Rolig RL, Moore-Faver D, Zabelshansky M, Wilson JH, Nairn RS. Role of ERCC1 in removal of long non-homologous tails during targeted homologous recombination. *Embo j*. 2000;19(20):5552-61.
62. Regateiro FJ. Manual de genética médica. Imprensa da Universidade de Coimbra ed. Coimbra2013. p. 496.
63. McNeil EM, Melton DW. DNA repair endonuclease ERCC1-XPF as a novel therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer therapy. *Nucleic Acids Res*. 40. England2012. p. 9990-10004.
64. Petruseva IO, Evdokimov AN, Lavrik OI. Molecular mechanism of global genome nucleotide excision repair. *Acta Naturae*. 2014;6(1):23-34.
65. Au WW, Navasumrit P, Ruchirawat M. Use of biomarkers to characterize functions of polymorphic DNA repair genotypes. *Int J Hyg Environ Health*. 2004;207(4):301-13.
66. Kirschner K, Melton DW. Multiple roles of the ERCC1-XPF endonuclease in DNA repair and resistance to anticancer drugs. *Anticancer Res*. 30. Greece2010. p. 3223-32.
67. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015;763:212-45.
68. Hanawalt PC. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*. 2002;21(58):8949-56.
69. Costa RM, Chigancas V, Galhardo Rda S, Carvalho H, Menck CF. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*. 2003;85(11):1083-99.
70. Mohrenweiser HW, Wilson DM, 3rd, Jones IM. Challenges and complexities in estimating both the functional impact and the disease risk associated with the extensive genetic variation in human DNA repair genes. *Mutat Res*. 2003;526(1-2):93-125.
71. Cooper GM. DNA Repair. 2000.
72. de Laat WL, Appeldoorn E, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. DNA structural elements required for ERCC1-XPF endonuclease activity. *J Biol Chem*. 1998;273(14):7835-42.
73. de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev*. 1999;13(7):768-85.

74. Ahmad A, Robinson AR, Duensing A, van Drunen E, Beverloo HB, Weisberg DB, et al. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*. 2008;28(16):5082-92.
75. Friedberg EC, Aguilera A, Gellert M, Hanawalt PC, Hays JB, Lehmann AR, et al. DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair (Amst)*. 2006;5(8):986-96.
76. ERCC1 excision repair cross-complementation group 1 [*Homo sapiens* (human)] 2015 [Pubmed:[Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2067>].
77. Zhang L, Wang J, Xu L, Zhou J, Guan X, Jiang F, et al. Nucleotide excision repair gene ERCC1 polymorphisms contribute to cancer susceptibility: a meta-analysis. 2012.
78. Database GHG. ERCC1 Gene - GeneCards | ERCC1 Protein | ERCC1 Antibody. 2015.
79. Caires IQdS, Caires-Lima R, Colombo R, Ramos CC, Machado KK, Siqueira SAC, et al. Expression of ERCC1 protein (excision repair cross complementing group 1) in patients with invasive carcinoma of the uterine cervix (CC) undergoing definitive chemoradiation (CR)2012.
80. Diaz-Padilla I, Amir E, Marsh S, Liu G, Mackay H. Genetic polymorphisms as predictive and prognostic biomarkers in gynecological cancers: a systematic review. *Gynecol Oncol*. 2012;124(2):354-65.
81. Doll CM, Aquino-Parsons C, Pintilie M, Klimowicz AC, Petrillo SK, Milosevic M, et al. The significance of tumoral ERCC1 status in patients with locally advanced cervical cancer treated with chemoradiation therapy: a multicenter clinicopathologic analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013;85(3):721-7.
82. Shirota Y, Stoecklacher J, Brabender J, Xiong YP, Uetake H, Danenberg KD, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2001;19(23):4298-304.
83. Kwon HC, Roh MS, Oh SY, Kim SH, Kim MC, Kim JS, et al. Prognostic value of expression of ERCC1, thymidylate synthase, and glutathione S-transferase P1 for 5-fluorouracil/oxaliplatin chemotherapy in advanced gastric cancer. *Ann Oncol*. 2007;18(3):504-9.
84. Jun HJ, Ahn MJ, Kim HS, Yi SY, Han J, Lee SK, et al. ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation. *Br J Cancer*. 2008;99(1):167-72.
85. Lord RV, Brabender J, Gandara D, Alberola V, Camps C, Domine M, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8(7):2286-91.

86. Ceppi P, Volante M, Novello S, Rapa I, Danenberg KD, Danenberg PV, et al. ERCC1 and RRM1 gene expressions but not EGFR are predictive of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine. *Ann Oncol.* 2006;17(12):1818-25.
87. Goyal S, Parikh RR, Green C, Schiff D, Moran MS, Yang Q, et al. Clinicopathologic significance of excision repair cross-complementation 1 expression in patients treated with breast-conserving surgery and radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;76(3):679-84.
88. Matsubara J, Nishina T, Yamada Y, Moriwaki T, Shimoda T, Kajiwarra T, et al. Impacts of excision repair cross-complementing gene 1 (ERCC1), dihydropyrimidine dehydrogenase, and epidermal growth factor receptor on the outcomes of patients with advanced gastric cancer. *Br J Cancer.* 2008;98(4):832-9.
89. Bellmunt J, Paz-Ares L, Cuello M, Cecere FL, Albiol S, Guillem V, et al. Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol.* 2007;18(3):522-8.
90. Weberpals J, Garbuio K, O'Brien A, Clark-Knowles K, Doucette S, Antoniouk O, et al. The DNA repair proteins BRCA1 and ERCC1 as predictive markers in sporadic ovarian cancer. *Int J Cancer.* 2009;124(4):806-15.
91. Saebo M, Skjelbred CF, Nexø BA, Wallin H, Hansteen IL, Vogel U, et al. Increased mRNA expression levels of ERCC1, OGG1 and RAI in colorectal adenomas and carcinomas. *BMC Cancer.* 2006;6:208.
92. Kamikozuru H, Kuramochi H, Hayashi K, Nakajima G, Yamamoto M. ERCC1 codon 118 polymorphism is a useful prognostic marker in patients with pancreatic cancer treated with platinum-based chemotherapy. *Int J Oncol.* 2008;32(5):1091-6.
93. Povey JE, Darakhshan F, Robertson K, Bisset Y, Mekky M, Rees J, et al. DNA repair gene polymorphisms and genetic predisposition to cutaneous melanoma. *Carcinogenesis.* 2007;28(5):1087-93.
94. Liang ZL, Song EK, Ko YB, Lee NR, Yhim HY, Noh HT, et al. Excision repair cross-complementation group 1 expression predicts response and survival in locally advanced cervical carcinoma patients treated with concurrent chemoradiotherapy. *Histopathology.* 2011;59(3):564-7.
95. Bai ZL, Wang YY, Zhe H, He JL, Hai P. ERCC1 mRNA levels can predict the response to cisplatin-based concurrent chemoradiotherapy of locally advanced cervical squamous cell carcinoma. *Radiat Oncol.* 7. England 2012. p. 221.
96. Kim MK, Cho KJ, Kwon GY, Park SI, Kim YH, Kim JH, et al. ERCC1 predicting chemoradiation resistance and poor outcome in oesophageal cancer. *Eur J Cancer.* 2008;44(1):54-60.

97. Scheil-Bertram S, Tylus-Schaaf P, du Bois A, Harter P, Oppitz M, Ewald-Riegler N, et al. Excision repair cross-complementation group 1 protein overexpression as a predictor of poor survival for high-grade serous ovarian adenocarcinoma. *Gynecol Oncol.* 2010;119(2):325-31.
98. Usanova S, Piee-Staffa A, Sied U, Thomale J, Schneider A, Kaina B, et al. Cisplatin sensitivity of testis tumour cells is due to deficiency in interstrand-crosslink repair and low ERCC1-XPF expression. *Mol Cancer.* 2010;9:248.
99. Zhao X, Zhang Z, Yuan Y, Yuan X. Polymorphisms in ERCC1 gene could predict clinical outcome of platinum-based chemotherapy for non-small cell lung cancer patients. *Tumour Biol.* 2014;35(8):8335-41.
100. Ozcan MF, Dizdar O, Dincer N, Balci S, Guler G, Gok B, et al. Low ERCC1 expression is associated with prolonged survival in patients with bladder cancer receiving platinum-based neoadjuvant chemotherapy. *Urol Oncol.* 2013;31(8):1709-15.
101. Doll CM, Prystajeky M, Eliasziw M, Klimowicz AC, Petrillo SK, Craighead PS, et al. Low ERCC1 mRNA and protein expression are associated with worse survival in cervical cancer patients treated with radiation alone. *Radiother Oncol.* 2010;97(2):352-9.
102. Qixing M, Gaochao D, Wenjie X, Rong Y, Feng J, Lin X, et al. Predictive Value of Ercc1 and Xpd Polymorphisms for Clinical Outcomes of Patients Receiving Neoadjuvant Therapy: A Prisma-Compliant Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(39):e1593.
103. Chung HH, Kim MK, Kim JW, Park NH, Song YS, Kang SB, et al. XRCC1 R399Q polymorphism is associated with response to platinum-based neoadjuvant chemotherapy in bulky cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2006;103(3):1031-7.
104. Prunoiu VM, Marincas MA, Cirimbei C, Ionescu S, Zurac S, Radu M, et al. The configuration of biomolecular markers in cancer of the uterine cervix. Personalized therapy. Monitoring and prognosis. *Chirurgia (Bucur).* 2015;110(2):144-50.
105. Helleday T. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res.* 2003;532(1-2):103-15.
106. Johnson RD, Jasin M. Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochem Soc Trans.* 2001;29(Pt 2):196-201.
107. Kim PM, Allen C, Wagener BM, Shen Z, Nickoloff JA. Overexpression of human RAD51 and RAD52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(21):4352-60.
108. Kowalczykowski SC. An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(11).
109. Li X, Heyer WD. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* 2008;18(1):99-113.

110. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* 2001;27(3):247-54.
111. van den Bosch M, Lohman PH, Pastink A. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Biol Chem.* 2002;383(6):873-92.
112. Tham KC, Kanaar R, Lebbink JH. Mismatch repair and homeologous recombination. *DNA Repair (Amst).* 2016;38:75-83.
113. Henning W, Sturzbecher HW. Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance. *Toxicology.* 2003;193(1-2):91-109.
114. Karran P. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev.* 2000;10(2):144-50.
115. Osman F, Subramani S. Double-strand break-induced recombination in eukaryotes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1998;58:263-99.
116. Paques F, Haber JE. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63(2):349-404.
117. West SC. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(6):435-45.
118. Aka P, Mateuca R, Buchet JP, Thierens H, Kirsch-Volders M. Are genetic polymorphisms in OGG1, XRCC1 and XRCC3 genes predictive for the DNA strand break repair phenotype and genotoxicity in workers exposed to low dose ionising radiations? *Mutat Res.* 2004;556(1-2):169-81.
119. NCBI. XRCC3 X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3 [*Homo sapiens* (human)] - Gene - NCBI: Pubs; 2016 [Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>].
120. Qin LY, Chen X, Li P, Yang Z, Mo WN. Association between the XRCC3 Thr241Met polymorphism and cervical cancer risk: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;14(11):6703-7.
121. Database GHG. XRCC3 Gene - GeneCards | XRCC3 Protein | XRCC3 Antibody. 2016.
122. Du L, Xiong T, He Q, Wang Y, Shen J, Peng Y, et al. The Thr241Met polymorphism in the XRCC3 gene is associated with increased risk of cancer in Chinese mainland populations. *Tumour Biol.* 2014;35(2):1371-6.
123. Zhang X, Zhang L, Tian C, Yang L, Wang Z. Genetic variants and risk of cervical cancer: epidemiological evidence, meta-analysis and research review. *Bjog.* 2014;121(6):664-74.

124. Matullo G, Guarrera S, Carturan S, Peluso M, Malaveille C, Davico L, et al. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int J Cancer*. 2001;92(4):562-7.
125. Martinez-Marignac VL, Rodrigue A, Davidson D, Couillard M, Al-Moustafa AE, Abramovitz M, et al. The effect of a DNA repair gene on cellular invasiveness: XRCC3 over-expression in breast cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(1):e16394.
126. Cheng J, Liu W, Zeng X, Zhang B, Guo Y, Qiu M, et al. XRCC3 is a promising target to improve the radiotherapy effect of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2015;106(12):1678-86.
127. Merlo LM, Maley CC. The role of genetic diversity in cancer. *J Clin Invest*. 2010;120(2):401-3.
128. Moran Gonzalez D, Jimenez Cabrera S, Dominguez-Gil Hurle A. [Pharmacogenetics in oncology]. *Med Clin (Barc)*. 2008;131(5):184-95.
129. Katara P. Single nucleotide polymorphism and its dynamics for pharmacogenomics. *Interdiscip Sci*. 2014;6(2):85-92.
130. Alwi ZB. The Use of SNPs in Pharmacogenomics Studies. *Malays J Med Sci*. 2005;12(2):4-12.
131. Monzo M, Navarro A, Ferrer G, Artells R. Pharmacogenomics: a tool for improving cancer chemotherapy. *Clin Transl Oncol*. 2008;10(10):628-37.
132. Bajpai D, Banerjee A, Pathak S, Jain SK, Singh N. Decreased expression of DNA repair genes (XRCC1, ERCC1, ERCC2, and ERCC4) in squamous intraepithelial lesion and invasive squamous cell carcinoma of the cervix. *Mol Cell Biochem*. 2013;377(1-2):45-53.
133. Chaudhary R, Singh B, Kumar M, Gakhar SK, Saini AK, Parmar VS, et al. Role of single nucleotide polymorphisms in pharmacogenomics and their association with human diseases. *Drug Metab Rev*. 2015:1-10.
134. Walko CM, McLeod H. Pharmacogenomic progress in individualized dosing of key drugs for cancer patients. *Nat Clin Pract Oncol*. 2009;6(3):153-62.
135. Chen P, Wiencke J, Aldape K, Kesler-Diaz A, Miike R, Kelsey K, et al. Association of an ERCC1 polymorphism with adult-onset glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9(8):843-7.
136. Fountzilas G, Kalogera-Fountzila A, Lambaki S, Wirtz RM, Nikolaou A, Karayannopoulou G, et al. MMP9 but Not EGFR, MET, ERCC1, P16, and P-53 Is Associated with Response to Concomitant Radiotherapy, Cetuximab, and Weekly Cisplatin in Patients with Locally Advanced Head and Neck Cancer. *J Oncol*. 2009;2009.
137. Li F, Sun X, Sun N, Qin S, Cheng H, Feng J, et al. Association between polymorphisms of ERCC1 and XPD and clinical response to platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Am J Clin Oncol*. 2010;33(5):489-94.

138. Ensembl. rs3212986 (SNP) - Population genetics - Homo sapiens - Ensembl genome browser 84 2016 [Available from: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core.
139. Zhang Q, Lv LY, Li BJ, Zhang J, Wei F. Investigation of ERCC1 and ERCC2 gene polymorphisms and response to chemotherapy and overall survival in osteosarcoma. *Genet Mol Res*. 2015;14(3):11235-41.
140. Ding YW, Gao X, Ye DX, Liu W, Wu L, Sun HY. Association of ERCC1 polymorphisms (rs3212986 and rs11615) with the risk of head and neck carcinomas based on case-control studies. *Clin Transl Oncol*. 2015;17(9):710-9.
141. Farnebo L, Tiefenbock K, Ansell A, Thunell LK, Garvin S, Roberg K. Strong expression of survivin is associated with positive response to radiotherapy and improved overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Int J Cancer*. 2013;133(8):1994-2003.
142. Ensembl. rs861539 (SNP) - Population genetics - Homo sapiens - Ensembl genome browser 84 2016 [Available from: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core.
143. Savas S, Kim DY, Ahmad MF, Shariff M, Ozcelik H. Identifying functional genetic variants in DNA repair pathway using protein conservation analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(5):801-7.
144. Lindh AR, Rafii S, Schultz N, Cox A, Helleday T. Mitotic defects in XRCC3 variants T241M and D213N and their relation to cancer susceptibility. *Hum Mol Genet*. 2006;15(7):1217-24.
145. Xu ZY, Loignon M, Han FY, Panasci L, Aloyz R. Xrcc3 induces cisplatin resistance by stimulation of Rad51-related recombinational repair, S-phase checkpoint activation, and reduced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;314(2):495-505.
146. Djansugurova LB, Perfilyeva AV, Zhunusova GS, Djantaeva KB, Iksan OA, Khussainova EM. The determination of genetic markers of age-related cancer pathologies in populations from Kazakhstan. *Front Genet*. 2013;4:70.
147. Alsbeih G, Al-Harbi N, El-Sebaie M, Al-Badawi I. HPV prevalence and genetic predisposition to cervical cancer in Saudi Arabia. *Infect Agent Cancer*. 2013;8(1):15.
148. Grizzi F, Chiriva-Internati M. Cancer: looking for simplicity and finding complexity. *Cancer Cell Int*. 62006. p. 4.
149. Ma Q, Lu AY. Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. *Pharmacol Rev*. 2011;63(2):437-59.
150. Lancaster A, Nelson MP, Meyer D, Single RM, Thomson G. PyPop: a software framework for population genomics: analyzing large-scale multi-locus genotype data. *Pac Symp Biocomput*. 2003:514-25.

151. Attia J, Thakkinstian A, McElduff P, Milne E, Dawson S, Scott RJ, et al. Detecting genotyping error using measures of degree of Hardy-Weinberg disequilibrium. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2010;9:Article 5.
152. Edwards AW. G. H. Hardy (1908) and Hardy-Weinberg equilibrium. *Genetics*. 2008;179(3):1143-50.
153. Hasegawa K, Kato R, Torii Y, Ichikawa R, Oe S, Udagawa Y. The relationship between ERCC1 expression and clinical outcome in patients with FIGO stage I to stage II uterine cervical adenocarcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2011;21(8):1479-85.
154. Lo Nigro C, Monteverde M, Riba M, Lattanzio L, Tonissi F, Garrone O, et al. Expression profiling and long lasting responses to chemotherapy in metastatic gastric cancer. *Int J Oncol*. 2010;37(5):1219-28.
155. Chen C, Wang F, Wang Z, Li C, Luo H, Liang Y, et al. Polymorphisms in ERCC1 C8092A predict progression-free survival in metastatic/recurrent nasopharyngeal carcinoma treated with cisplatin-based chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;72(2):315-22.
156. Okuda K, Sasaki H, Hikosaka Y, Kawano O, Yukiue H, Yano M, et al. Excision repair cross complementation group 1 polymorphisms predict overall survival after platinum-based chemotherapy for completely resected non-small-cell lung cancer. *J Surg Res*. 2011;168(2):206-12.
157. Krivak TC, Darcy KM, Tian C, Armstrong D, Baysal BE, Gallion H, et al. Relationship between ERCC1 polymorphisms, disease progression, and survival in the Gynecologic Oncology Group Phase III Trial of intraperitoneal versus intravenous cisplatin and paclitaxel for stage III epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(21):3598-606.
158. Wang Y, Chen J, Li X, He Y, Hu B, Ji C, et al. Genetic polymorphisms of ERCC1 and their effects on the efficacy of cisplatin-based chemotherapy in advanced esophageal carcinoma. *Oncol Rep*. 2011;25(4):1047-52.
159. Duenas-Gonzalez A, Campbell S. Global strategies for the treatment of early-stage and advanced cervical cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2016;28(1):11-7.
160. Liu H, Qi B, Guo X, Tang LQ, Chen QY, Zhang L, et al. Genetic variations in radiation and chemotherapy drug action pathways and survival in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma treated with chemoradiotherapy. *PLoS One*. 2013;8(12):e82750.
161. Khrunin AV, Moisseev A, Gorbunova V, Limborska S. Genetic polymorphisms and the efficacy and toxicity of cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients. *Pharmacogenomics J*. 2010;10(1):54-61.
162. Kim HS, Kim MK, Chung HH, Kim JW, Park NH, Song YS, et al. Genetic polymorphisms affecting clinical outcomes in epithelial ovarian cancer patients treated with

taxanes and platinum compounds: a Korean population-based study. *Gynecol Oncol*. 2009;113(2):264-9.

163. Rumiato E, Cavallin F, Boldrin E, Cagol M, Alfieri R, Basso D, et al. ERCC1 C8092A (rs3212986) polymorphism as a predictive marker in esophageal cancer patients treated with cisplatin/5-FU-based neoadjuvant therapy. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(11):597-604.

164. Kalikaki A, Kanaki M, Vassalou H, Souglakos J, Voutsina A, Georgoulas V, et al. DNA repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome in advanced non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2009;10(2):118-23.

165. Matos A, Moutinho J, Pinto D, Medeiros R. The influence of smoking and other cofactors on the time to onset to cervical cancer in a southern European population. *Eur J Cancer Prev*. 2005;14(5):485-91.

166. Roura E, Castellsague X, Pawlita M, Travier N, Waterboer T, Margall N, et al. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: results from the EPIC cohort. *Int J Cancer*. 2014;135(2):453-66.

167. Mileshekin L, Paramanathan A, Kondalsamy-Chennakesavan S, Bernshaw D, Khaw P, Narayan K. Smokers with cervix cancer have more uterine corpus invasive disease and an increased risk of recurrence after treatment with chemoradiation. *Int J Gynecol Cancer*. 2014;24(7):1286-91.

168. Zhou W, Liu G, Park S, Wang Z, Wain JC, Lynch TJ, et al. Gene-smoking interaction associations for the ERCC1 polymorphisms in the risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(2):491-6.

169. Hou R, Liu Y, Feng Y, Sun L, Shu Z, Zhao J, et al. Association of single nucleotide polymorphisms of ERCC1 and XPF with colorectal cancer risk and interaction with tobacco use. *Gene*. 2014;548(1):1-5.

170. Lu B, Li J, Gao Q, Yu W, Yang Q, Li X. Laryngeal cancer risk and common single nucleotide polymorphisms in nucleotide excision repair pathway genes ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5 and XPA. *Gene*. 2014;542(1):64-8.

171. Sad LM, Younis SG, Elity MM. Prognostic and predictive role of ERCC1 protein expression in locally advanced stage III non-small cell lung cancer. *Med Oncol*. 2014;31(7):58.

172. Waggoner SE, Darcy KM, Fuhrman B, Parham G, Lucci J, 3rd, Monk BJ, et al. Association between cigarette smoking and prognosis in locally advanced cervical carcinoma treated with chemoradiation: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2006;103(3):853-8.

173. Chen X, Sun H, Ren S, Kim Curran V, Zhang L, Zhou S, et al. Association of XRCC3 and XPD751 SNP with efficacy of platinum-based chemotherapy in advanced NSCLC patients. *Clin Transl Oncol*. 2012;14(3):207-13.
174. De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, Morthier R, De Paepe A, Vral A, et al. Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;62(4):1140-9.
175. He X, Ye F, Zhang J, Cheng Q, Shen J, Chen H. Susceptibility of XRCC3, XPD, and XPG genetic variants to cervical carcinoma. *Pathobiology*. 2008;75(6):356-63.
176. Krupa R, Sliwinski T, Wisniewska-Jarosinska M, Chojnacki J, Wasylecka M, Dziki L, et al. Polymorphisms in RAD51, XRCC2 and XRCC3 genes of the homologous recombination repair in colorectal cancer--a case control study. *Mol Biol Rep*. 2011;38(4):2849-54.
177. Font A, Salazar R, Maurel J, Taron M, Ramirez JL, Tabernero J, et al. Cisplatin plus weekly CPT-11/docetaxel in advanced esophagogastric cancer: a phase I study with pharmacogenetic assessment of XPD, XRCC3 and UGT1A1 polymorphisms. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;62(6):1075-83.
178. Ren S, Zhou S, Wu F, Zhang L, Li X, Zhang J, et al. Association between polymorphisms of DNA repair genes and survival of advanced NSCLC patients treated with platinum-based chemotherapy. *Lung Cancer*. 2012;75(1):102-9.
179. Ott K, Rachakonda PS, Panzram B, Keller G, Lordick F, Becker K, et al. DNA repair gene and MTHFR gene polymorphisms as prognostic markers in locally advanced adenocarcinoma of the esophagus or stomach treated with cisplatin and 5-fluorouracil-based neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(9):2688-98.
180. Chew HK, Doroshow JH, Frankel P, Margolin KA, Somlo G, Lenz HJ, et al. Phase II studies of gemcitabine and cisplatin in heavily and minimally pretreated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(13):2163-9.
181. de las Penas R, Sanchez-Ronco M, Alberola V, Taron M, Camps C, Garcia-Carbonero R, et al. Polymorphisms in DNA repair genes modulate survival in cisplatin/gemcitabine-treated non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol*. 2006;17(4):668-75.
182. Shen XY, Lu FZ, Wu Y, Zhao LT, Lin ZF. XRCC3 Thr241Met polymorphism and clinical outcomes of NSCLC patients receiving platinum-based chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(8):e69553.

183. Kirwan JM, Symonds P, Green JA, Tierney J, Collingwood M, Williams CJ. A systematic review of acute and late toxicity of concomitant chemoradiation for cervical cancer. *Radiother Oncol.* 2003;68(3):217-26.
184. Marnitz S, Martus P, Kohler C, Stromberger C, Asse E, Mallmann P, et al. Role of Surgical Versus Clinical Staging in Chemoradiated FIGO Stage IIB-IVA Cervical Cancer Patients-Acute Toxicity and Treatment Quality of the Uterus-11 Multicenter Phase III Intergroup Trial of the German Radiation Oncology Group and the Gynecologic Cancer Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2016;94(2):243-53.
185. Zhang Y, Yang Z, Zhou Y, Pan J, Liu Y. Efficacy of concurrent single-agent chemotherapy using radiotherapy in patients with cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(6):8661-73.
186. Bentzen SM. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(9):702-13.
187. Suk R, Gurubhagavatula S, Park S, Zhou W, Su L, Lynch TJ, et al. Polymorphisms in ERCC1 and grade 3 or 4 toxicity in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2005;11(4):1534-8.

VIII. Anexos



Anexo I

Abstract aceite para publicação sob a forma de poster no *2nd ASPIC International Congress*, no Porto (Abril de 2016).

ERCC1 A8092C (rs3212986) polymorphism: a prognostic value in cervical cancer?

S. Soares^{1,2}, A. Coelho^{1,2}, A. Nogueira^{1,3,4}, D. Pereira^{1,2,5}, I. Bravo⁶, R. Medeiros^{1,2,3,7}

- 1- Molecular Oncology and Viral Pathology Group – Research Center, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal
- 2- ICBAS, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Porto, Porto, Portugal
- 3- Research Department, Portuguese League Against Cancer (NRNorte), Porto, Portugal
- 4- FMUP, Faculty of Medicine of Porto University, Porto, Portugal
- 5- Oncology Department, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal
- 6- Medical Physics, Radiobiology and Radioprotection Group– Research Center, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal
- 7- CEBIMED, Faculty of Health Sciences of Fernando Pessoa University, Porto, Portugal

Introduction

In 2012, cervical cancer was the fourth most commonly diagnosed cancer in women and there were 528,000 new cases. Per day, it is estimated that several DNA-damaging events occur at a rate of 10,000 to 1,000,000 molecular lesions per cell. ERCC1 plays an essential role in the Nucleotide Excision Repair (NER) pathway and it is the main system to repair a wide variety of DNA damage, particularly bulky adducts, crosslinking and oxidative DNA damage. Due to the importance of genomic integrity maintenance, genes coding for DNA repair molecules have been proposed as candidate for cancer-susceptibility genes. This gene is a more promising predictive biomarker of response to chemoradiotherapy, because its expression is associated with the repair mechanisms of ionizing radiation and cellular mechanisms of resistance to cisplatin. The aim of this study was to evaluate the influence of the *ERCC1 A8092C* polymorphism as prognostic marker for cervical cancer patients.

Materials and Methods

We analysed ERCC1 A8092C polymorphism genotypes in genomic DNA isolated from peripheral blood of 241 patients with cervical cancer who underwent a chemotherapy in combination with radiotherapy. Genotyping was performed by Taqman™ allelic discrimination methodology. Kaplan-Meier method and Log-Rank test were used to obtain and analyse the survival curves.

Results and Discussion

The frequencies obtained for the AA, AC and CC genotypes were 10,4%, 32,3% and 57,3%, respectively. Concerning the overall survival rates found using Kaplan-Meier method, we found no association to the patients ERCC1 genotypes ($p=0,739$). Therefore, our results indicate that there is no any influence of the ERCC1 genetic variants on clinical outcome of cervical cancer patients. In literature, this polymorphism has been significantly associated with many neoplasias, like ovarian cancer, lung cancer, esophagus cancer. This is the first study evaluating the role of the ERCC1 A8092C genetic variants in cancer prognosis and clinical outcomes of cervical cancer patients. Further functional studies regarding ERCC1 expression according to ERCC1 A8092C polymorphism genotypes should be conducted in order to validate this hypothesis.

Anexo II

Abstract aceite para publicação sob a forma de poster no *2nd ASPIC International Congress*, no Porto (Abril de 2016).

Possible influence of the *P53 Arg72Pro* polymorphism (rs1042522) in the clinical outcome of cervical cancer patients

A. Coelho^{1,2}, S. Soares^{1,2}, A. Nogueira^{1,3,4}, D. Pereira^{1,2,5}, I. Bravo⁶, R. Medeiros^{1,2,3,7}

- 1- Molecular Oncology and Viral Pathology Group – Research Center, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal
- 2- ICBAS, Abel Salazar Institute for the Biomedical Sciences, University of Porto, Porto, Portugal
- 3- Research Department, Portuguese League Against Cancer (NRNorte), Porto, Portugal
- 4- FMUP, Faculty of Medicine of Porto University, Porto, Portugal
- 5- Oncology Department Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal
- 6- Medical Physics, Radiobiology and Radioprotection Group – Research Center, Portuguese Institute of Oncology, Porto, Portugal
- 7- CEBIMED, Faculty of Health Sciences of Fernando Pessoa University, Porto, Portugal

Introduction

Cervical cancer is the fourth most common cancer in women, and the seventh overall, with an estimated 528,000 new cases and 266,000 deaths worldwide in 2012. Currently, this malignant disease represents 7.5% of all female cancer deaths. DNA double-strand breaks (DSBs) are among the most cytotoxic DNA damages and failure to repair these injuries results in genomic instability. The *P53* gene is considered to be the guardian of the genome due to its role on cell cycle arrest, DNA repair activation and regulation of apoptosis. Given the functional relevance of the damage cellular response pathways on carcinogenesis, potential associations between genetic polymorphisms in genes involved in response of the cell to DNA damage, cancer risk and efficacy to therapy have been intensively evaluated. We conducted this study to show the possible influence of the *P53 Arg72Pro* polymorphism (rs1042522) in overall survival in cervical cancer patients.

Material and methods

Retrospective cohort study that includes 241 Caucasian patients with histological diagnosis of cervical cancer, FIGO stages IB2-IVA, treated with cisplatin-based chemotherapy and concomitant radiotherapy. *P53 Arg72Pro* polymorphism was analyzed by Taqman™ Allelic Discrimination methodology. The associations between this polymorphism and overall survival were estimated by Kaplan-Meier method and using Log Rank test. A p value < 0.05 was considered significant.

Results and Discussion

The *P53 Arg72Pro* polymorphism frequencies for homozygous Arg/Arg, heterozygous Arg/Pro and homozygous Pro/Pro were 0.56, 0.33, and 0.11, respectively. Our results demonstrate that the overall survival was statistically different according to the patients *P53 Arg72Pro* genotypes. The patients heterozygous Arg/Pro present a higher overall survival than patients homozygous Arg/Arg and Pro/Pro (135 months vs. 106 months; $p = 0.043$). These preliminary results may contribute towards a better understanding of the role of genetic polymorphisms in DNA damage response genes in treatment response in cervical cancer patients.